

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Ärztl. Leiter des Zentrums für Anästhesiologie und Intensivmedizin:

Univ.-Prof. Dr. med. Alwin E. Goetz

Komm. Leiter der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie:

Prof. Dr. med. Christian Zöllner

***In vitro* Analyse des Einflusses von Infusionslösungen auf die inflammatorische Reaktion polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Martin Strutz

aus Bremen

Hamburg 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 16.11.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. A. E. Goetz

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: Prof. Dr. L. Diehl

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Sepsis / SIRS | 1 |
| 1.2 | Pathophysiologie der SIRS | 2 |
| 1.3 | Physiologische Funktion neutrophiler Granulozyten | 4 |
| 1.4 | Pathophysiologische Rolle der PMN | 5 |
| 1.5 | Infusions- und Volumentherapie | 6 |
| 2 | Arbeitshypothese und Fragestellung | 9 |
| 3 | Methodik | 10 |
| 3.1 | Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten | 10 |
| 3.2 | Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl | 10 |
| 3.3 | FACS-Analyse | 12 |
| 3.3.1 | Durchflusszytometrie im FACScan® | 12 |
| 3.3.2 | Aufbau und Funktionsweise eines Durchflusszytometers | 12 |
| 3.3.3 | Auswertung der Daten des FACScan® | 14 |
| 3.3.4 | Dosisfindung für Versuche zur FACS-Analyse | 15 |
| 3.3.5 | Immunfluoreszenzfärbung | 17 |
| 3.3.6 | Versuchsaufbau für die FACS-Analyse | 18 |
| 3.4 | Myeloperoxidase – Assay | 20 |
| 3.4.1 | Messung der MPO-Aktivität | 20 |
| 3.4.2 | Dosisfindung des Stimulans | 21 |
| 3.4.3 | Versuchsaufbau für die MPO-Messung | 24 |
| 3.5 | Superoxidanionen – Assay | 26 |
| 3.6 | rt-PCR Analyse von <i>in vitro</i> stimulierten PMN | 28 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.6.1 | Isolierung von mRNA..... | 28 |
| 3.6.2 | Bestimmung der RNA-Konzentration..... | 29 |
| 3.6.3 | Synthese komplementärer DNA (cDNA)..... | 29 |
| 3.6.4 | Amplifizierung der cDNA: PCR..... | 30 |
| 3.6.5 | Identifizierung der PCR-Produkte: Gelelektrophorese..... | 31 |
| 3.6.6 | Quantifizierung der Gelelektrophoresebanden..... | 32 |
| 3.7 | Versuchsprotokoll aller Versuchsreihen..... | 33 |
| 3.8 | Applizierte Substanzen..... | 34 |
| 3.8.1 | Lipopolysaccharid..... | 34 |
| 3.8.2 | Phorbol 12-myristate 13-acetate..... | 34 |
| 3.8.3 | Physiologische Kochsalzlösung..... | 34 |
| 3.8.4 | Hydroxyethylstärke..... | 35 |
| 3.8.5 | Gelatine..... | 35 |
| 3.9 | Statistik..... | 36 |
| 4 | Material..... | 37 |
| 4.1 | Zellen..... | 37 |
| 4.2 | Geräte..... | 37 |
| 4.3 | Reagenzien für die Zellseparation..... | 37 |
| 4.4 | Stimulation..... | 38 |
| 4.5 | Infusionslösungen..... | 38 |
| 4.6 | Antikörper..... | 38 |
| 4.7 | MPO-Assay..... | 38 |
| 4.8 | Superoxidanionen-Assay..... | 39 |
| 4.9 | rt-PCR..... | 39 |
| 5 | Ergebnisse..... | 42 |
| 5.1 | Durchflusszytometrie..... | 42 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.1.1 | Vorversuche..... | 42 |
| 5.1.2 | Autofluoreszenz..... | 43 |
| 5.1.3 | CD 11b - Expression..... | 44 |
| 5.1.4 | CD 66b - Expression..... | 47 |
| 5.1.5 | Cytochrom b ₅₅₈ - Expression | 49 |
| 5.2 | Myeloperoxidase – Essay | 51 |
| 5.2.1 | Vorversuche..... | 51 |
| 5.2.2 | MPO – Messung..... | 52 |
| 5.3 | Superoxidanionen – Essay..... | 54 |
| 5.3.1 | Vorversuche..... | 54 |
| 5.3.2 | SOD – Messung | 55 |
| 5.4 | rt-PCR Untersuchung..... | 57 |
| 6 | Diskussion..... | 60 |
| 6.1 | Diskussion der Methodik | 61 |
| 6.1.1 | humane Granulozyten | 61 |
| 6.1.2 | Antikoagulation | 62 |
| 6.1.3 | Stimulation | 63 |
| 6.1.4 | Infusionsmedien..... | 64 |
| 6.1.5 | Durchflusszytometrie | 67 |
| 6.1.6 | Oberflächenmoleküle..... | 68 |
| 6.1.7 | Myeloperoxidase..... | 70 |
| 6.1.8 | SOD-Assay..... | 70 |
| 6.1.9 | rt-PCR Untersuchung | 72 |
| 6.2 | Diskussion der Ergebnisse..... | 73 |
| 6.2.1 | Adhäsionsmoleküle..... | 74 |
| 6.2.2 | Radikalbildung | 78 |
| 6.2.3 | Degranulation | 81 |

| | |
|--|-----------|
| 7 Zusammenfassung | 84 |
| 8 Literaturverzeichnis | 88 |
| 9 Anhang..... | 99 |
| 9.1 Danksagung | 99 |
| 9.2 Lebenslauf..... | 100 |
| 9.3 Eidesstattliche Versicherung | 101 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|---|
| ACCP | American College of Chest Physicians |
| AK | Antikörper |
| ARDS | Acute Respiratory Distress Syndrome |
| ATS | American Thoracic Society |
| bp | Basenpaare |
| CD | Cluster of differentiation |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CRP | C-reaktives Protein |
| DIC | Disseminated Intravascular Coagulation |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ESIM | European Society of Intensive Care Medicine |
| Fa | Firma |
| FACS | Fluorescence activated cell sorting |
| FAD | Flavin Adenosin Dinukleotid |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate |
| fMLP | Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin |
| GAPDH | Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase |
| HES | Hydroxyethylstärke |
| HTAB | Hexadecyltrimethylammoniumbromid |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| IgG | Immunglobulin G |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MOV | Multiorganversagen |

| | |
|-----------------------------|---|
| MPO | Myeloperoxidase |
| mRNA | Messenger-Ribonukleinsäure |
| n | Anzahl |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADP+ | Oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| NADPH | Reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| O ₂ | Sauerstoff |
| O ₂ ⁻ | Superoxidanion |
| p | Signifikanzniveau |
| PBS | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| PKC | Phosphokinase C |
| PMA | Phorbol Myristate Acetate |
| PMN | Polymorphkernige neutrophile Leukozyten |
| PRR | Pathogen-Recognition Receptors |
| RNase | Ribonuklease |
| rt-PCR | Reverse transcriptase polymerase chain reaction |
| SCCM | Society of Critical Care Medicine |
| SIRS | Systemic Inflammatory Response Syndrome |
| SIS | Surgical Infection Society |
| SOD | Superoxiddismutase |
| TF | Tissue Factor |
| TLR | Toll-like Receptor |
| TMB | Tetramethylbenzidin |

1 Einleitung

1.1 Sepsis / SIRS

Die generalisierte Inflammation in Form eines SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) bzw. einer Sepsis ist nach wie vor eine der Haupttodesursachen der Patienten in der Intensivmedizin. In Deutschland beträgt die Inzidenz der schweren Sepsis und des septischen Schocks 110/100.000. Die Prävalenz der Sepsis auf allen deutschen Intensivstationen liegt bei 11-14%, die Prävalenz der schweren Sepsis bei 10-12%. Dabei beträgt die Mortalität der schweren Sepsis ca. 50 % [23, 36, 37, 72]. Somit sind Sepsis und SIRS weiterhin zentrale Probleme auf den Intensivstationen. Eine unverändert hohe Mortalität und steigende Behandlungskosten unterstreichen den Stellenwert dieser Erkrankung. Aus epidemiologischen Daten der USA und Europa geht hervor, dass eine Infektion der Atemwege mit 63 % der häufigste Auslöser für eine schwere Sepsis ist, gefolgt von intra-abdominellen Infektionen mit 25,3 % [3, 5, 13].

Mögliche Ursache dafür ist, dass viele Patienten infolge schwerer Erkrankungen oder nach großen abdominalen Operationen, Verbrennungen, Pankreatitis, Trauma, Sepsis und sogar schon nach relativ kleinen Eingriffen wie Koloskopien eine akute Endotoxämie erleiden [26, 108]. Der Auslöser dafür ist eine Translokation von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) in den Blutkreislauf, die ein generalisiertes Entzündungsgeschehen auslösen, welches als „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS) bezeichnet wird. LPS gehört in die Gruppe der Endotoxine, die als Bestandteil der Oberfläche von gram-negativen Bakterien eine Schlüsselfunktion in der Aktivierung von Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten, Endothel oder den Zellen der glatten Muskulatur hat.

Das Syndrom der generalisierten Inflammation wurde lange Zeit einheitlich mit dem Begriff der „Sepsis“ umschrieben, worunter alle Erkrankungen fielen, die eine generalisierte Entzündungsreaktion aufwiesen. Erst im Jahr 1991 wurde vom American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) in einer Konferenz unter der Leitung von R. Bone die Terminologie der Krankheitsbilder von SIRS, Sepsis und schwerer Sepsis international

verbindlich definiert [17, 18, 69]. Im Jahr 2001 wurde dieses Ergebnis von 1991 von der Consensus Conference by the Society of Critical Care Medicine (SCCM), der European Society of Intensive Care Medicine (ESIM), des American College of Chest Physicians (ACCP), der American Thoracic Society (ATS) und der Surgical Infection Society (SIS) nochmals weiterentwickelt [19].

Die vereinheitlichte Definition von SIRS und Sepsis nach Bone et al. [17, 18, 19] sollte dazu führen, dass Patienten mit diesem Krankheitsbild frühzeitig entdeckt und therapiert werden, da ein früher Start der Therapie entscheidend für den Erfolg der Behandlung ist [90]. Bei Patienten in einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock kann nur in ca. 30 % der Fälle ein Erreger nachgewiesen werden, und das auch nur mit einer zeitlichen Verzögerung von Tagen. Die einzige kausale Therapieoption ist deshalb aktuell noch die kalkulierte antimikrobielle Therapie [88]. Die wichtigste supportive Therapie der Sepsis ist eine zielorientierte Infusions- und Volumentherapie zur Stabilisierung der Hämodynamik. Es ist unbedingt notwendig, die pathophysiologischen Vorgänge in der systemischen Inflammationsreaktion zu verstehen, um die pathologischen Prozesse therapieren zu können.

1.2 Pathophysiologie der SIRS

Eine lokalisierte Entzündungsreaktion infolge einer Verletzung ist ein physiologischer Prozess zur kontrollierten Bekämpfung einer Infektion zum Schutz des Körpers. Es kann jedoch zu einer generalisierten Entzündungsreaktion mit Aktivierung des gesamten Immunsystems kommen. Diesen Zustand bezeichnet man „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS).

Das klinische Syndrom der SIRS beruht auf einer komplexen, systemischen inflammatorischen Reaktion [17, 18, 19], ausgelöst durch die Invasion pathogener Mikroorganismen. Es führt zur Aktivierung zahlreicher physiologischer zellulärer und humoraler Abwehrmechanismen, die primär auf die Bekämpfung der Infektion ausgerichtet sind. Wenn diese unkontrolliert und überschießend aktiviert werden, können dieselben Mechanismen jedoch auch eine Schädigung körpereigenen Gewebes bis hin zum Organversagen zur Folge haben [31].

In der Pathogenese der Sepsis können verschiedene Stadien unterschieden werden. Zu Beginn kommt es durch die Erkennung mikromolekularer Strukturen von Erregern zur Initiation der Entzündungsreaktion. Dies erfolgt über Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren (PRR), die sich sowohl transmembranös als auch im Zytoplasma befinden. Zu den transmembranösen PRRs gehören die Toll-like Rezeptoren (TLRs), an denen die Erreger oder deren Toxine binden. Über diese Rezeptoren kommt es zur Aktivierung der Immunantwort. Diese kennzeichnet sich u. a. durch die Produktion und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, sowie einer Aktivierung des Gerinnungssystems [48].

Polymorphkernige neutrophile Leukozyten (PMN) spielen in dieser Phase eine zentrale und entscheidende Rolle. Denn sie sind nicht nur unverzichtbar für die schnelle Beseitigung eingedrungener pathologischer Mikroorganismen, sondern sie können auch erheblich zur Gewebeschädigung beitragen, wenn sie infolge einer überschießenden Stimulation verstärkt an das Gefäßendothel adhären, ins Gewebe gelangen und dort zytotoxische Sauerstoffradikale und proteolytische Enzyme direkt in den Extrazellularraum freisetzen [28, 111]. PMN sind daher mitverantwortlich für die Störung der Endothelfunktion und das Versagen der Mikrozirkulation im septischen Schock, die schließlich zu einer Beeinträchtigung der Sauerstoffversorgung und der Ausbildung einer ausgeprägten Hypoxie im betroffenen Gewebe führen.

Die initial in Gang gesetzte inflammatorische Kaskade potenziert sich in der Folge selbst. Durch die freigesetzten pro-inflammatorischen Mediatoren kommt es zur Verstärkung der Entzündungsreaktion, da auch die Mediatoren an die PRR binden. Durch die Freisetzung von Tissue Factor (TF) wird die Gerinnungskaskade aktiviert und aktiviertes Thrombin produziert. Als Folge kommt es zu Mikrothromben, Verschluss von Kapillaren im Endstromgebiet und gipfelt häufig in der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC).

Auf diese Verstärkung der inflammatorischen Reaktion folgt als negative Rückkopplung mit einer Latenz von Tagen bis Wochen die zweite Phase, die anti-inflammatorische. Die überschießende Aktivität des Immunsystems wird kompensatorisch herunter reguliert. In dieser Phase besteht ein verminderter Immunschutz, wodurch der Erwerb neuer Infektionen besonders gefährlich ist.

1.3 Physiologische Funktion neutrophiler Granulozyten

Die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) bilden mit ca. 60-70% den größten Teil der gesamten Leukozytenpopulation. Die neutrophilen Granulozyten gehören wie die Monozyten und Makrophagen zu den phagozytischen Zellen und sind Teil der unspezifischen und schnellen Immunantwort. Kommt es zu einem Eintritt von Erregern, übernehmen die Zellen der unspezifischen Immunantwort die initiale Bekämpfung, bevor die spezifische Immunantwort über Bildung von B-Lymphozyten mit speziellen Antikörpern gezielt vorgehen kann. Den Granulozyten stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung, um schnell Erreger zu zerstören [68].

Nach Eintreten eines Erregers wird über Gewebemakrophagen das Endothel der Blutgefäße aktiviert, die daraufhin Oberflächenmoleküle exprimieren. An diesen binden bei Kontakt die Granulozyten, die darüber stimuliert werden. Durch die Aktivierung werden auf der Zelloberfläche der Leukozyten Adhäsionsmoleküle exprimiert, die sich im Zellinneren in Vesikeln befinden. Über die Adhäsionsmoleküle entsteht eine feste Bindung zwischen Leukozyt und Endothel (Adhäsion). Der Leukozyt kann nun entlang des Endothels bis zum Interzellularspalt wandern (Rolling) und dort aus dem Gefäß ins Interstitium gelangen (Diapedese). Im Interstitium folgt der neutrophile Granulozyt chemotaktischen Reizen aktiv zum Ort der Entzündung. Chemotaktische Wirkstoffe sind z. B. das bakterielle Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP), Leukotrien B₄, der platelet-activating factor und das Interleukin 8 (s. Abb. 1) [22].

Kommt es zum Kontakt mit einem Erreger, stehen den PMN mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, diesen zu bekämpfen. Sie sind in der Lage, sowohl eingedrungene Bakterien als auch beschädigte und abgestorbene Zellen des Organismus durch Bindung des Agens diesen zu phagozytieren. Im Zellinneren verschmilzt der Phagozyt mit Lysosomen, die das aufgenommene Material durch oxidative und nicht-oxidative zytotoxische Agenzien enzymatisch abbauen [97].

Eine weitere Reaktion ist, dass aktivierte PMN direkt in das umliegende Gewebe zytotoxische Substanzen sezernieren. Dies erfolgt zum einen durch Exozytose von Vesikeln mit zytotoxischem Inhalt, zum anderen durch Freisetzung

radikalbildender Enzyme. Der nicht-oxidative Abbau wird vermittelt durch die Freisetzung lysosomaler Enzyme (Degranulation), wogegen die oxidative Zellerstörung durch Sauerstoff-Metabolite verursacht wird, welche von der granulozytären NADPH-Oxidase produziert wurden (Oxidativer Burst) [70]. Obwohl die eigentliche Zellerstörung intrazellulär erfolgt, kann die inadäquate Freisetzung zytotoxischer Substanzen in die extrazelluläre Matrix zur Beschädigung des Körpergewebes führen [111], was zu den bereits genannten Komplikationen einer Sepsis führen kann.

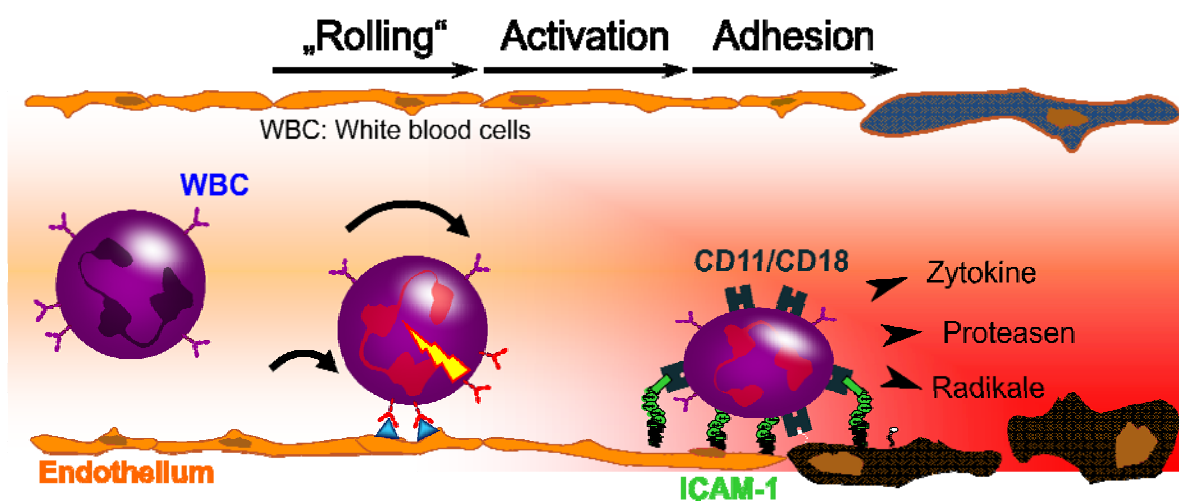


Abbildung 1: Pathophysiologie der systemischen Inflammation (mod. Springer T [98])

1.4 Pathophysiologische Rolle der PMN

Die größte Komplikation und der Grund für den letalen Ausgang einer Sepsis ist das Multiorgan-Versagen (MOF). Es bildet die Endstrecke der pathologischen Vorgänge einer systemischen Aktivität der Immunantwort, welches ein multifaktorieller Vorgang ist.

Einen wesentlichen Teil tragen die aktivierten Leukozyten bei. Der für die Erregerabwehr sehr nützliche und notwendige Mechanismus ist bei der SIRS überschießend. Die PMN sezernieren ungerichtet die zytotoxischen Substanzen

und Sauerstoffradikale, so dass es statt zu einer lokalen Infektabwehr zu einer unmittelbaren Organschädigung durch körpereigene Mechanismen kommt. Die Freisetzung von Radikalen und zytotoxischen Substanzen führen zu einer Beschädigung vom Endothel der Blutgefäße, wodurch es zu Flüssigkeitsaustritt und zu Ödemen durch *capillary leak* kommt. Außerdem schädigen die Leukozyten, nachdem sie aus den Gefäßen ins Interstitium durch Migration gelangt sind, direkt das Gewebe durch die dort freigesetzten toxischen Metaboliten. An vielen Organen führen diese Vorgänge zu direkten Organdysfunktionen. Eines der sehr häufig betroffenen Organe ist die Lunge mit akutem Lungenversagen oder ARDS (Adult Respiratory Distress Syndrome) [1]. Der Lungenschaden ist die häufigste Organdysfunktion, da die Lunge eine riesige Gefäßoberfläche bietet, an der die Leukozyten anhaften können und weil schon unter physiologischen Bedingungen sich ein Leukozytenpool in der Lunge befindet.

Durch die Endothelschädigung und dem damit entstandenen *capillary leak* entsteht durch eine Volumenverschiebung ein klinisch relevanter intravasaler Volumenmangel. Es ist einer der Hauptaufgaben, diesen Mangel auszugleichen, da ein mangelhafter Ausgleich des Volumenmangels die Organschädigung weiter vorantreibt.

1.5 Infusions- und Volumentherapie

Durch den Mechanismus des *capillary leak* kommt es zu einem verstärkten Flüssigkeitsaustritt aus dem Gefäßsystem in das umliegende Gewebe. Der resultierende Volumenmangel bewirkt ohne einen adäquaten Ausgleich eine Verminderung der kardialen Vorlast und des Herzzeitvolumens. Dieses würde, nicht therapiert, in einer Minderperfusion der Organe münden, was die Schädigung dieser und die Gefahr des MOV verstärkt.

Um den Volumenmangel auszugleichen, stehen der Intensivmedizin zum einen die kristalloiden Infusionslösungen wie NaCl oder balancierte Lösungen wie Sterofundin® zur Verfügung. Die Kristalloide können ihrerseits durch den fehlenden onkotischen Druck das Gewebeödem in den Organen verstärken und

die Organschädigung vorantreiben. Zum anderen gibt es die kolloidalen Lösungen wie Hydroxyethylstärke, Albumin oder Gelatine.

Die Wahl des am besten geeigneten Volumenersatzes bei diesem komplexen Krankheitsbild wird seit Jahren kontrovers diskutiert und ist Gegenstand diverser klinischer und experimenteller Studien [78, 80, 81, 96]. Das Albumin wurde in unserer Studie nicht berücksichtigt, da bereits für diesen Volumenexpander bei ICU-Patienten kein Überlebensvorteil gezeigt werden konnte [42]. Für Hydroxyethylstärke-haltige Infusionslösungen konnte in experimentellen und tierexperimentellen Bedingungen ein antiinflammatorischer Effekt gezeigt werden [34, 39, 40, 41, 54, 77, 100]. Der Einsatz kolloidaler Infusionslösungen in der Intensivmedizin ist aber in Verruf geraten. In zwei Studien konnte eine erhöhte Mortalität nach Langzeittherapie mit HES nachgewiesen werden [24, 82, 83]. Allerdings wurden in diesen Studien Kolloide mit größeren Stärkemolekülen verwendet. Eine erhöhte Inzidenz an renalen Komplikationen mit Nierenersatzverfahren wurde in drei Studien nachgewiesen, die sowohl HES 130, als auch HES 200 verwendeten [86]. In aktuellen Studien wie der CHRISTAL-Trial oder CHEST-Studie [6, 73, 84] konnte kein Unterschied bzgl. der Mortalität zwischen den Infusionslösungen festgestellt werden. Nach der aktuellen S3-Leitlinie zur Volumentherapie bei Erwachsenen von 2014 wird im perioperativen Bereich zur Therapie einer Hypovolämie der Einsatz von HES und Ringer gleichwertig empfohlen, in der intensivmedizinischen Therapie des Volumenmangels bei der Sepsis wird der Verzicht von HES empfohlen [10]. Es besteht zu einer endgültigen Entscheidung ein Bedarf an weiteren Studien zu diesem Thema. Wichtig wären große, klinische Studien, die die Effekte der Volumentherapie mit den unterschiedlichen Lösungen in der Initialphase der Sepsis untersuchen, in der die Leukozytenaktivierung abläuft. Eine entscheidende Frage, auch dieser Arbeit, ist es, ob durch eine Volumentherapie mit HES in der Initialphase die überschießende Aktivierung der Leukozyten günstig beeinflusst werden kann und somit das Ausmaß der Nebenwirkungen, der Organschäden und des Multiorganversagens eingedämmt werden kann.

In der Literatur finden sich Studien, die einen möglichen antiinflammatorischen Effekt auf Leukozyten beobachten [91]. Allerdings wurde bisher in keiner Studie

der direkte Einfluss verschiedener Volumenersatzmittel speziell auf die Aktivität und Aktivierbarkeit der PMN durchgeführt.

2 Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Initialphase der Entwicklung eines akuten Multiorganversagens als lebensbedrohliche Komplikation systemischer inflammatorischer Krankheitsbilder ist durch die Akkumulation und die generalisierte Aktivierung von Leukozyten in den Mikrostrombahnen gekennzeichnet. Durch vermehrte Expression von Oberflächenmolekülen, u. a. Adhäsionsmoleküle, die die Emigration ins Interstitium ermöglichen, sowie Oberflächenmoleküle, die Radikale produzieren und durch Degranulation von lysosomalen Enzymen wird die inflammatorische Reaktion verursacht.

Neueste Studien lassen entzündungshemmende Wirkungen von Hydroxyethylstärke (HES) enthaltenden Infusionslösungen vermuten. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass durch Interaktion von HES die Adhäsion, Diapedese und Sekretion zytotoxischer Substanzen vermindert wurde. Ob HES direkte antiinflammatorische Effekte auf PMN hat, ist bisher völlig ungeklärt.

Für diese Studie wurde folgende Hypothese zugrunde gelegt: Durch die Applikation von HES kommt es zu einer reduzierten inflammatorischen Reaktion der Granulozyten hinsichtlich der Expression von Oberflächenmolekülen, der Degranulation von Enzymen und der Produktion von zytotoxischen Radikalen. Die o. g. Eigenschaften zum Verlassen der Blutbahn und der zytotoxischen Wirkung im Gewebe werden durch diese kolloidalen Infusionslösungen direkt an den Leukozyten gehemmt.

Ziel der Studie war es, erstmals Effekte kolloidaler Volumensubstitutionslösungen mit Hydroxyethylstärke (HES) auf isolierte und *in vitro* stimulierte neutrophile Granulozyten (PMN) und deren inflammatorische Reaktion zu analysieren. Im Vergleich dazu wurde der Effekt von NaCl und Gelatine untersucht. Dazu wurden PMN *in vitro* stimuliert und die Wirkung der Infusionslösungen auf die Expression von Adhäsionsmolekülen CD11b und CD66b, die Expression der radikalbildenden NADPH-Oxidase Cytochrom b_{558} , der Degranulation des radikalbildenden Enzyms Myeloperoxidase sowie die Menge der produzierten Sauerstoffradikale untersucht.

3 Methodik

3.1 Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten

Zur Gewinnung humaner Granulozyten wurden gesunden, freiwilligen Probanden zu Versuchsbeginn 20 ml Blut durch sterile Venenpunktion entnommen, das mit Heparin (10 I.E. / ml) antikoaguliert wurde. Als erster Schritt zur Isolierung humaner Leukozyten wurde das Blut in ein 50 ml Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson GmbH, USA) zu 10 ml Dextran (5%) gegeben und für 30 Minuten sedimentiert. Das Dextran führt zu einer Aggregation der Erythrozyten untereinander, so dass diese sich deutlich schneller sedimentieren als die anderen zellulären Bestandteile. Im Überstand befanden sich nach Ablauf der Zeit Granulozyten, Lymphozyten und Thrombozyten.

Der zellhaltige Überstand wurde vorsichtig auf 10 ml Ficoll (Ficoll-Trennlösung, Dichte 1.077 g/ml; Biochrom, Berlin, Deutschland) geschichtet. Die Zellen wurden mit 200 x g bei Raumtemperatur für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Die Granulozyten und die verbliebenen Erythrozyten setzten sich als Pellet am Boden ab während Lymphozyten und Thrombozyten im Überstand verblieben. Der Überstand wurde mit einer Pasteur-Pipette verworfen. Zur Reinigung des Pellets von Dextran und Ficoll wurden die Zellen mit 40 ml PBS resuspendiert und mit 200 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet mit 4 ml PBS resuspendiert [21, 76].

3.2 Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl

Die Vitalität der isolierten Zellen wurde mittels der Trypanblau-Färbung ermittelt. Bei dieser Methode ist es möglich, unter den separierten und angereicherten neutrophilen Granulozyten über eine Ausschlussfärbung die toten von lebenden Zellen zu trennen. Nur bei den lebenden Zellen sind aktive Transportmechanismen intakt, die den Farbstoff ausschließen. Tote Zellen dagegen färben sich blau an. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau (0,25%ige Trypanblau-Lösung, Serva, Heidelberg, Deutschland) gemischt.

Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauer-Kammer gezählt. Die Zahl der vitalen Granulozyten betrug $5-7,5 \cdot 10^6$ /ml.

3.3 FACS-Analyse

3.3.1 Durchflusszytometrie im FACScan®

Die Durchflusszytometrie analysiert anhand der Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelne Zellen und deren intra- oder extrazelluläre Strukturen. Es ist ein optisches Messsystem, das Zellen differenzieren und über mehrere Lichtfilter Fluoreszenzmessungen in verschiedenen Wellenlängen durchführen kann. Untersucht werden kann jede Art von Zelle. In unserer Studie verwendeten wir polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN). Des Weiteren können unterschiedliche Strukturen quantifiziert werden, indem diese mit fluoreszierenden Antikörpern markiert werden. Dabei kann es sich um extrazelluläre Substanzen wie z. B. Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche handeln, aber auch intrazelluläre Bestandteile, wie z. B. DNA/RNA-Anteile oder der Proteingehalt können quantifiziert werden.

Das Prinzip des Durchflusszytometers besteht in der Messung optischer Signale unterschiedlicher Qualität, wie Lichtstreuung und Fluoreszenz. Diese Signale entstehen bei Kontakt der Zellen mit einem Lichtstrahl. Die Zellen werden, während sie langsam durch das Zytometer fließen, von einer Lichtquelle beleuchtet. Als Lichtquelle dient ein Argon-Laser mit der Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$. Der Laser hat die Eigenschaft, dass er monochromatisches, gerichtetes Licht emittiert, das von einer hohen Energiedichte ist. Bei Auftreffen des Lichtes auf die Zelle kommt es zur Lichtstreuung, anhand dessen die Größe und die Granularität bestimmt werden können. Durch Anregung fluoreszierender Antikörper können mit Filtern für die jeweiligen Wellenlängen verschiedene Fluoreszenzfarben detektiert werden. Das Durchflusszytometer analysiert eine festgelegte Zahl von zehntausend Zellen und speichert die Ergebnisse auf einen angeschlossenen Computer zur Auswertung [87].

3.3.2 Aufbau und Funktionsweise eines Durchflusszytometers

Der Transport der Flüssigkeiten im Durchflusszytometer erfolgt nach dem Prinzip der „hydrodynamischen Fokussierung“. Über eine Leitung wird mittels Pumpe ein

kontinuierlicher Fluss in der Messkammer produziert. Aus dem Probenröhrchen wird die Zellsuspension mittels Überdruck in diese Leitung gedrückt, wo die Zellen von dem dort bestehenden laminaren Flüssigkeitsstrom erfasst werden. Kurz vor der Lichtquelle verjüngt sich die Leitung, so dass die Zellen wie Perlen auf der Kette aufgereiht sind und nur eine zur Zeit in den Messbereich kommt.

Im Messbereich wird die einzelne Zelle von dem Argon-Laser angestrahlt. Beim Auftreffen des Lichtes auf die Zelle wird die Richtung der Strahlen verändert und es entsteht die Lichtstreuung (s. Abb.2). Das Ausmaß der Streuung hängt von der Größe der Zelle und der Menge der intrazellulären Granula ab.

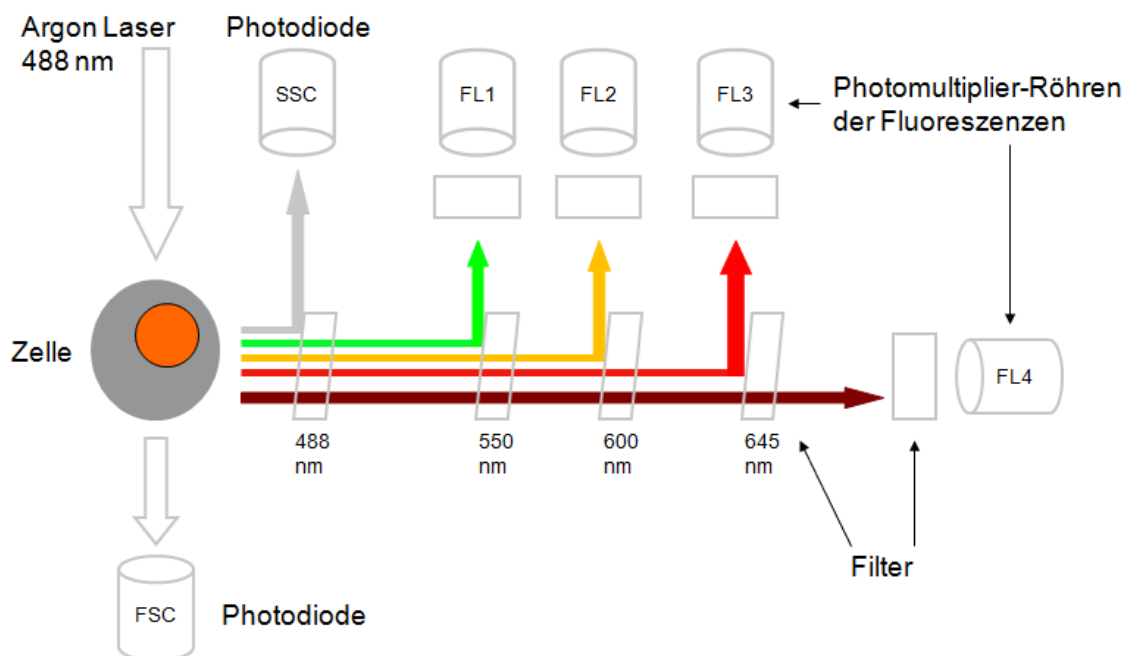


Abbildung 2: schematischer Aufbau FACSscan®

Das Vorwärtsstreulicht ist das Streulicht, das dem Verlauf des einfallenden Lichtstrahls folgt. Es ist ein Maß für die Größe der beleuchteten Zelle. Das Licht, das orthogonal zum einfallenden Lichtstrahl streut, wird als Seitwärtsstreulicht bezeichnet und ist ein Anhalt für die intrazellulär gespeicherte Menge an Granula. Im Seitwärtsstreulicht werden auch die fluoreszierenden Antikörper angeregt und gemessen.

3.3.3 Auswertung der Daten des FACScan®

Das FACScan® detektiert zehntausend Zellen, die in der Suspension gelöst sind und trägt diese als Punkt in ein Diagramm. Auf diesem Histogramm ist das Vorwärtsstreulicht gegen das Seitwärtsstreulicht aufgetragen. Diese Einstellung führt zur Aufteilung der Zellen nach Größe und Granularität. Dadurch entstehen verschiedene Punktwolken, entsprechend der Zellgruppen. Neutrophile Granulozyten sind verhältnismäßig groß und enthalten viele Granula. Die Gruppe der Granulozyten wird in dem Histogramm mit einem Gate versehen, um ausschließlich in dieser Population nach den fluoreszierenden Antikörpern zu suchen, die an der Zelloberfläche gebunden sind (s. Abb. 3). In einem zweiten Histogramm wird das Vorwärtsstreulicht gegen Fluoreszenzintensität aufgetragen. In dieser Abbildung teilen sich die Zellen in zwei Gruppen. In der einen Gruppe sind die Zellen dargestellt, die viele Antikörper gebunden haben, in der anderen die Zellen mit kaum gebundenen Antikörpern. Das Computerprogramm errechnet die Größe der beiden Gruppen und gibt so das Verhältnis der Antikörperbindung an.

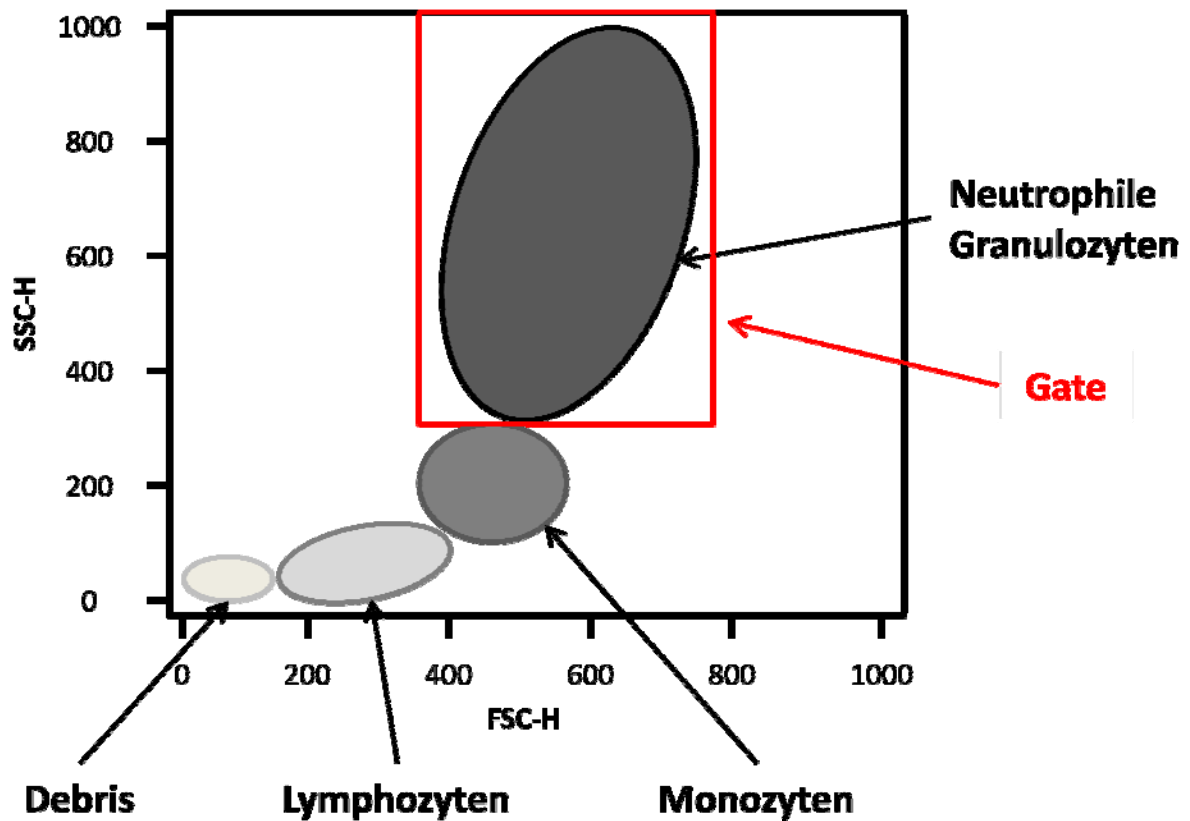


Abbildung 3: Schema Histogramm einer FACS-Analyse

3.3.4 Dosisfindung für Versuche zur FACS-Analyse

Die in-vitro Stimulation von polymorph-kernigen Granulozyten kann durch verschiedene Substanzen bewirkt werden. Die beiden Substanzen, die am häufigsten verwendet werden, sind das LPS (Lipopolysaccharid von *E. coli* 0111:B4) und das PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate). Wir haben nach dem unten abgebildeten Versuchsschema mit jeweils 250 μ l der Zellsuspension das effektivste Stimulans und die optimale Dosierung festgelegt. Die Inkubationszeit betrug auch hier zwei Stunden, wie es bei den eigentlichen Versuchen zur Studie auch sein sollte. Im Anschluss wurden die Zellen mit den Antikörpern markiert und in der Durchflusszytometrie gemessen. (s. Tab. 1)

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe ergaben, dass die Expression der Oberflächenmoleküle unter der Stimulation mit LPS 100 μ g/ml am effektivsten war.

| Gruppe | Reagentien + 250µl Leukozytensuspension |
|--|--|
| Kontrolle | 750 µl PBS |
| LPS¹ 20 µg/ml | 10 µl LPS ¹ + 740 µl PBS |
| LPS¹ 100 µg/ml | 50 µl LPS ¹ + 700 µl PBS |
| LPS¹ 200 µg/ml | 100 µl LPS ¹ + 650 µl PBS |
| LPS¹ 1000 µg/ml | 500 µl LPS ¹ + 250 µl PBS |
| PMA² 10 ng/ml | 10 µl PMA ² + 740 µl PBS |
| PMA² 50 ng/ml | 50 µl PMA ² + 700 µl PBS |
| PMA² 200 ng/ml | 200 µl PMA ² + 550 µl PBS |
| PMA² 500 ng/ml | 500 µl PMA ² + 250 µl PBS |
| LPS¹ 20 µg/ml + PMA² 10 ng/ml | 10 µl LPS ¹ + 10 µl PMA ² + 730 µl PBS |
| LPS¹ 100 µg/ml + PMA² 50 ng/ml | 50 µl LPS ¹ + 50 µl PMA ² + 650 µl PBS |
| LPS¹ 200 µg/ml + PMA² 100 ng/ml | 100 µl LPS ¹ + 100 µl PMA ² + 550 µl PBS |
| LPS¹ 400 µg/ml + PMA² 500 ng/ml | 200 µl LPS ¹ + 500 µl PMA ² + 50 µl PBS |

¹ LPS: Lipopolysaccharid von E. coli 0111:B4; 2 mg/ml
² PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate; 1 µg/ml

Tabelle 1: Dosisfindung für Versuche zur FACS-Analyse

3.3.5 Immunfluoreszenzfärbung

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Reaktion abgebrochen, indem die Versuchsansätze auf Eis gelagert wurden. Den Ansätzen wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das zu messende Oberflächenmolekül zugegeben. Als zweites kam ein FITC-markierter (Fluorescein isothiocyanate) anti-Mouse Antikörper dazu. Um ein gutes Verhältnis zwischen Antikörpern und Molekülen zu gewährleisten, wurde eine Verdünnungsreihe für beide Antikörper durchgeführt. Die Verdünnungsreihe ergab, dass der erste Antikörper 1:500 und der zweite 1:250 verdünnt werden musste. Verwendet wurden folgende Antikörper, entsprechend der zu untersuchenden Moleküle:

| Oberflächenmolekül | Antikörper |
|----------------------------------|---|
| CD 11b | monoclonal mouse IgG1 antibody to human CD 11b; <i>Acris Antibodies GmbH, Germany</i> |
| CD 66b | monoclonal mouse IgG1 antibody to human CD 66b; <i>Acris Antibodies GmbH, Germany</i> |
| Flavocytochrome b ₅₅₈ | monoclonal mouse IgG1 antibody to human Flavocytochrome b ₅₅₈ <i>Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Japan</i> |
| FITC | FITC-Monoclonal Rat Anti-Mouse IgG1; <i>Invitrogen Corporation, USA</i> |

Tabelle 2: Antikörper für FACS-Analyse

Den Ansätzen, die in der Summe ein Volumen von einem Milliliter hatten, wurden 90 µl entnommen. Dazu kamen 60 µl des ersten Antikörpers in einer Verdünnung von 1:500. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten wurden die Zellen gewaschen und mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Der zweite Antikörper hat das fluoreszierende FITC-Molekül gebunden, das im Durchflusszytometer detektiert werden kann. Dieser Antikörper bindet an den primären Antikörper, der bereits an den Oberflächenmolekülen gebunden ist, so dass die Menge der im Zytometer gemessenen fluoreszierenden Antikörper mit der Menge der exprimierten Oberflächenmoleküle korreliert.

3.3.6 Versuchsaufbau für die FACS-Analyse

In unserem Versuchsaufbau sollten vier verschiedene Infusionslösungen miteinander verglichen werden. Die Infusionslösungen waren NaCl 0,9%, Hydroxyethylstärke (HES) 130/0.4, HES 200/0.5 und Gelatine 4%. Dazu haben wir zehn Versuchsgruppen gebildet (s. Tab. 3), in denen die Leukozyten über zwei Stunden inkubiert wurden. Die ersten beiden dienten als negative und positive Kontrolle, um das Maß der Autoreaktion und der größtmöglichen Reaktion als Referenz festzulegen. Es wurden 250 µl der Leukozytensuspension in ausschließlich phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) inkubiert und in der Positivkontrolle mit 100 µg/ml LPS stimuliert.

Zum Ausschluss einer Reaktion der neutrophilen Granulozyten mit den Infusionsmedien wurden die Zellen in der dritten bis sechsten Gruppe unter Zugabe von jeweils 250 µl NaCl 0.9%, HES 130/0.4, HES 200/0.5 und Gelatine unstimuliert über zwei Stunden inkubiert. In den Gruppen sieben bis zehn wurde den Ansätzen als Stimulans 100 µg/ml LPS (2 mg/ml) zugesetzt und ebenfalls über zwei Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die Antikörper gegen die auf der Oberfläche exprimierten Moleküle zugegeben.

| Gruppe | Reagentien + 250µl Leukozytensuspension |
|---------------------------------------|---|
| 1. neg. Kontrolle | 750 µl Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) |
| 2. pos. Kontrolle | 50 µl LPS ¹ + 700 µl PBS |
| 3. NaCl | 250 µl NaCl 0.9% (25% v/v) + 500 µl PBS |
| 4. HES 130 | 250 µl HES 130/0.4 ² + 500 µl PBS |
| 5. HES 200 | 250 µl HES 200/0.5 ² + 500 µl PBS |
| 6. Gelatine | 250 µl Gelatine ³ + 500 µl PBS |
| 7. NaCl + LPS¹ | 50 µl LPS ¹ + 250 µl NaCl 0.9% + 450 µl PBS |
| 8. HES 130 + LPS¹ | 50 µl LPS ¹ + 250 µl HES 130/0.4 ² + 450 µl PBS |
| 9. HES 200 + LPS¹ | 50 µl LPS ¹ + 250 µl HES 200/0.5 ² + 450 µl PBS |
| 10. Gelatine + LPS¹ | 50 µl LPS ¹ + 250 µl Gelatine ³ + 450 µl PBS |

¹ LPS: Lipopolysaccharid von E. coli 0111:B4; 2 mg/ml

² HES: Hydroxyethylstärke 20 mg/ml
³ Gelatine: Gelatinepolysuccinat 10 mg/ml

Tabelle 3: Versuchsprotokoll FACS-Analyse

3.4 Myeloperoxidase – Assay

Die Quantifizierung der Sekretion der Myeloperoxidase (MPO) diene als weiterer Marker, um die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten zu quantifizieren. Die Myeloperoxidase kommt überwiegend in den neutrophilen Granulozyten vor, in geringem Maße ist sie auch in Monozyten vorhanden. Es ist ein 146 kD großes Enzym, das in großer Menge in den azurophilen Granula der PMN gespeichert wird. Die MPO macht 5% des Gesamtgewichtes der neutrophilen Granulozyten aus. Strukturell ist das Enzym ein Tetramer, bestehend aus zwei leichten (14 kDa) und zwei schweren (59 kDa) Ketten, die mit Disulfidbrücken zusammengehalten werden [11].

Durch Stimulation der Granulozyten kommt es zur Exozytose der intrazellulären Granula und somit zur Freisetzung der Myeloperoxidase. Die toxische Wirkung der MPO besteht darin, dass diese mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) Chloridionen oxidiert und dadurch das eigentliche hochwirksame Oxidans, hypochlorige Säure (HOCl) entstehen lässt. Das als Substrat notwendige H_2O_2 entsteht durch die membranständige NADPH-Oxidase.

In vivo katalysiert die Myeloperoxidase (MPO) die Bildung von Hypochlorit und anderen Oxidationsprodukten des Chloridions aus Wasserstoffperoxid und Chlorit. Dies wird in dem MPO-Assay *in vitro* simuliert, indem 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid oxidiert wird. Dadurch wird das ursprünglich farblose TMB, in seinen blau-grünen Oxidationsstatus überführt.

3.4.1 Messung der MPO-Aktivität

Die Myeloperoxidase katalysiert *in vivo* in Anwesenheit von H_2O_2 Chloridionen, so dass hypochlorige Säure und Wasser entstehen. In unserem Assay wurde anstelle der Chloridionen das Chromogen TMB als Substrat verwendet, das unter Oxidation durch die MPO eine blaue Farbe annimmt. Dazu wurde unmittelbar vor Beginn der Reaktion das Substratgemisch aus 2 ml TMB mit 2 ml H_2O_2 erstellt. Die durch die Oxidation entstehende Extinktionsänderung wurde mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 691 nm alle 3 min über einen Zeitraum von

ca. 20 min gemessen. Als Photometer benutzten wir einen Mikroplattenreader von Thermo[®].

Die Bestimmung des Leerwertes erfolgte anhand eines Gemisches aus 75 µl TMB-H₂O₂ und 75µl HTAB.

Um eine Aussage über die produzierten Extinktionskurven treffen zu können, musste eine Aktivitätsmessung mit einer Standard-Peroxidase durchgeführt werden. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe mit Meerrettich-Peroxidase erstellt, sodass anhand der in der Verdünnungsreihe bekannten Peroxidase-Konzentrationen das Verhältnis zwischen Extinktionsänderungsgeschwindigkeit und Enzymaktivität auf Proportionalität hin überprüft werden konnte. Die Meerrettichperoxidase (bereits auf 200 U/ml verdünnt) wurde auf 1/100 (entspricht 2 U/ml), 1/4000 (entspricht 50 mU/ml), 1/8000 (entspricht 25 mU/ml), 1/10.000 (entspricht 20 mU/ml), 1/13.333 (entspricht 15 mU/ml), 1/20.000 (entspricht 10 mU/ml), 1/40.000 (entspricht 5 mU/ml) verdünnt.

Zur photometrischen Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität wurde 75µl der jeweiligen Probe (Standardverdünnungen und Granulozytenproben) auf eine 96 *Well*-Platte gegeben. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 75µl der TMB-H₂O₂-Mischung gestartet und die Messung unmittelbar gestartet.

3.4.2 Dosisfindung des Stimulans

Dieser Versuchsreihe wurde ein Vorversuch vorgeschaltet, indem das geeignete Stimulans und deren Dosierung ermittelt wurde, um eine höchstmögliche Aussagekraft bezüglich der Sekretion der Myeloperoxidase und somit der Aktivierbarkeit der Leukozyten zu erhalten. Getestet wurde das Endotoxin LPS (Lipopolysaccharid von *E. coli* 0111:B4) und PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat). In der Literatur ist beschrieben, dass die Aktivierung durch PMA v. a. zu einer verstärkten Exozytose führt. Wir erstellten drei Gruppen á 4 Versuchsansätzen 8s. Tab. 4): In den ersten beiden wurde LPS + PMA kombiniert (1. LPS 200 µg/ml + PMA 100 ng/ml; 2. LPS 200 µg/ml + PMA 200 ng/ml), in der dritten haben wir die Leukozyten ausschließlich mit PMA stimuliert (3. PMA 200 ng/ml). Durch die

Stimulation mittels PMA 200 ng/ml war die Sekretion der Myeloperoxidase am effektivsten.

| Gruppe | Reagentien + 250µl Leukozytensuspension |
|---|---|
| LPS ¹ 200 µg/ml + PMA ² 100 ng/ml | 100 µl LPS ¹ + 100 µl PMA ² + 550 µl PBS |
| LPS ¹ 200 µg/ml + PMA ² 100 ng/ml | 100 µl LPS ¹ + 100 µl PMA ² + 250 ml NaCl + 300 ml PBS |
| LPS ¹ 200 µg/ml + PMA ² 100 ng/ml | 100 µl LPS ¹ + 100 µl PMA ² + 250 ml HES + 130/0.4 + 300 ml PBS |
| LPS ¹ 200 µg/ml + PMA ² 100 ng/ml | 100 µl LPS ¹ + 100 µl PMA ² + 250 ml HES 200/0.5 + 300 ml PBS |
| LPS ¹ 200 µg/ml + PMA ² 200 ng/ml | 100 µl LPS ¹ + 200 µl PMA ² + 450 µl PBS |
| LPS ¹ 200 µg/ml + PMA ² 200 ng/ml | 100 µl LPS ¹ + 200 µl PMA ² + 250 ml NaCl + 200 ml PBS |
| LPS ¹ 200 µg/ml + PMA ² 200 ng/ml | 100 µl LPS ¹ + 200 µl PMA ² + 250 ml HES 130/0.4 + 200 ml PBS |
| LPS ¹ 200 µg/ml + PMA ² 200 ng/ml | 100 µl LPS ¹ + 200 µl PMA ² + 250 ml HES 200/0.5 + 200 ml PBS |
| PMA ² 200 ng/ml | 200 µl PMA ² + 550 µl PBS |
| PMA ² 200 ng/ml | 200 µl PMA ² + 250 ml NaCl + 300 ml PBS |
| PMA ² 200 ng/ml | 200 µl PMA ² + 250 ml HES 130/0.4 + 300 ml PBS |
| PMA ² 200 ng/ml | 200 µl PMA ² + 250 ml HES 200/0.5 + 300 ml PBS |

¹ LPS: Lipopolysaccharid von E. coli 0111:B4; 2 mg/ml ² PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate; 1 µg/ml

Tabelle 4: Dosisfindung MPO-Messung

3.4.3 Versuchsaufbau für die MPO-Messung

Die Sekretion der Myeloperoxidase aus stimulierten neutrophilen Granulozyten sollte unter dem Einfluss verschiedener Infusionslösungen bestimmt werden. Analog zu der Versuchsreihe für die Durchflusszytometrie wurde Kochsalz (NaCl 0,9%), HES 130 (HES 130/0,4 15 mg/ml), HES 200 (HES 200/0,5 25 mg/ml) und Gelatine (Gelatine-Polysuccinal 10mg/ml) verwendet. (s. Tab. 5) Die Inkubation erfolgte in Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf, Deutschland). In jeden Ansatz der Gruppe 3-6 kam eine definierte Menge der Infusionslösung von 250 µl. Von der Suspension mit den isolierten neutrophilen Granulozyten wurden 250 µl auf die Ansätze verteilt, so dass die Konzentration der Leukozyten pro Ansatz ca. 2,5 Mio. Zellen / ml betrug. Die Einteilung in die Versuchsgruppen und die Zusammensetzung der Reagentien ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

| | Versuchsgruppe | Reagentien + 250µl Leukozytensuspension |
|----|----------------|---|
| 1. | neg. Kontrolle | 750 µl Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) |
| 2. | pos. Kontrolle | 200 µl PMA ¹ + 550 µl PBS |
| 3. | NaCl | 200 µl PMA ¹ + 250µl NaCl 0.9% + 300 µl PBS |
| 4. | HES 130 | 200 µl PMA ¹ + 250µl HES 130/0.4 ² + 300 µl PBS |
| 5. | HES 200 | 200 µl PMA ¹ + 250µl HES 200/0.5 ² + 300 µl PBS |
| 6. | Gelatine | 200 µl PMA ¹ + 250µl Gelatine ³ + 300 µl PBS |

¹ PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate ² HES: Hydroxyethylstärke 20 mg/ml

³ Gelatine: Gelatinepolysuccinat 10 mg/ml

Tabelle 5: Versuchsprotokoll MPO-Messung

Da eine Stimulation nur in den Gruppen 2-6 durchgeführt wurde, haben wir den Ansätzen dieser Gruppen als Stimulans 200 µl PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat, 1µg/ml) hinzugefügt. Die Dauer der Inkubation und Stimulation wurde auf zwei Stunden festgelegt, da wir speziell die Akutreaktion der Leukozyten untersuchen wollten. Außerdem konnte in diesem Versuchsaufbau bei längerer Inkubationszeit das Überleben für den Versuch ausreichender Zellen nicht sicher gewährleistet werden.

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach 30 min, 1, 1,5 und 2 Stunden. Dazu wurden den Ansätzen jeweils 100µl Zellsuspension entnommen. Die Granulozyten wurden mit maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert, aus dem zellfreien Überstand wurden 80 µl entnommen und diese mit 80 µl HTAB-Lösung (0,5% Hexadecyltrimethylammoniumbromid) versetzt, anschließend bis zur Messung auf Eis gelagert.

3.5 Superoxidanionen – Assay

Der Nachweis von Sauerstoffradikalen dient der Bestimmung der Aktivität von Granulozyten. Die Produktion und Freisetzung von Radikalen ist eine der ersten Reaktionen auf eine Stimulation und somit ein Marker für die Entzündungsreaktion. In den Versuchen wurde die Mengen an produzierten O_2^- Radikalen als der Anteil der durch Superoxiddismutase (SOD) inhibierte Cytochrom C - Reduktion bestimmt. Das Cytochrom C^{3+} ist im Reaktionsgemisch in der oxidierten Form (99,5%) vorhanden und wird durch das O_2^- - Radikal zu Cytochrom C^{2+} reduziert [85].



Diese Reduktionsreaktion bewirkt eine Absorptionzunahme, so dass das Cytochrom C spektrometrisch nachweisbar wird. Bei der Reaktion gibt das Sauerstoffradikal ein Elektron ab, das Cytochrom C verändert durch die Aufnahme des Elektrons seine Farbe. Das reduzierte Cytochrome C kann bei einer Wellenlänge von 550 nm detektiert werden.

Die Reduktion von Cytochrom C ist nicht spezifisch für O_2^- -Radikale. Die Reduktion kann auch unabhängig erfolgen durch Substanzen, die im Gewebe enthalten sind, wie z. B. Ascorbinsäure und L-Glutathion, aber auch zelluläre Reduktasen [101]. Um die Spezifität der Messung von Sauerstoffradikalen zu erhöhen, wird in einem Vergleichsansatz das Enzym Superoxiddismutase (SOD) beigegeben. Die SOD katalysiert in einer Reaktion die Sauerstoffradikale zu O_2 .

SOD katalysiert die Reaktion[2].



Folglich ergibt sich die O_2^- - spezifische Cytochrom C Reduktion aus der Differenz der Cytochrom C Reduktion im Reaktionsansatz ohne SOD und der Cytochrom C Reduktion im Vergleichsansatz mit SOD [43]. Das entstehende Wasserstoffperoxid im Ansatz mit SOD hat dabei keinen Einfluss auf die Cytochrom C - Reduktion, was wir in Kontrolluntersuchungen mit zusätzlicher Gabe von Katalase nachwiesen und sich mit den Angaben der Literatur deckt. Die Absorptionsdifferenz zwischen Reaktions - und Vergleichsansatz wurde mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten ($E_{550\text{ nm}} = 2.1 \times 10^4 \text{ [mol/L]}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in $\mu\text{mol } O_2^-$ umgerechnet.

Die Isolation der PMN erfolgte nach dem bisher genutzten Verfahren. Der Versuchsaufbau war gleich den vorherigen Protokollen. (s. Tab. 5) In den Vorversuchen zeigte sich, dass die Stimulation der Leukozyten zur Messung der SOD mittels PMA 20 ng/ml am effektivsten war. Die Messungen der Sauerstoffradikale erfolgte nach 30, 60 und 120 Minuten.

3.6 rt-PCR Analyse von *in vitro* stimulierten PMN

Der Einfluss der Infusionslösungen auf die Expression der Oberflächenmoleküle von neutrophilen Granulozyten auf mRNA-Ebene in einer systemischen Inflammation wurde mittels Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (rt-PCR) untersucht. Untersucht wurden die Oberflächenmoleküle, die bereits in den Versuchen zur FACS-Analyse untersucht wurden.

In dieser Versuchsreihe wurde humanes Vollblut über 10h inkubiert und stimuliert. Die Länge von zehn Stunden haben wir in Vorversuchen ermittelt. Die Versuchsgruppen waren nahezu analog zu den vorangegangenen Versuchen eine Kontrollgruppe ohne Infusionslösung, eine NaCl-Gruppe, eine HES 130-Gruppe, eine HES 200-Gruppe. Eine Gelatine-Gruppe wurde in dieser Versuchsreihe nicht angelegt. Stimuliert wurden die Zellen mit 100 ng/ml LPS. Nach Beendigung der Stimulationszeit wurden die Leukozyten nach bekanntem Protokoll isoliert, die Zellen wurden homogenisiert und die mRNA isoliert. Aus der mRNA wurde dann mittels reverser Transkriptase komplementäre DNA (cDNA) gebildet und anschließend durch PCR-Technik amplifiziert. Dafür wurden spezifische Primer für die Oberflächenmoleküle CD 11b, CD 18, die Bestandteile des Flavocytochrom b_{558} , β -Actin und GAPDH verwendet. Zur Auftrennung und Visualisierung der PCR-Produkte wurde eine Gelelektrophorese auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten 1% Agarosegel durchgeführt. Als Kontrollgen wurden die GAPDH (Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase) und das β -Actin verwendet, welche in allen Gruppen gleich stark exprimiert sein sollten.

3.6.1 Isolierung von mRNA

Die mRNA aus den neutrophilen Granulozyten wurde mittels eines Kits (Rneasy Kit, Quagen, Hilde) isoliert. Dabei wurden zur Homogenisierung die Rnase-freien Leukozyten für 20-40 sec in 350 μ l eines RLT-Puffers inkubiert, denen zu diesem Zweck 2-Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg) in einer Konzentration von 10 μ l/ml zugefügt wurde. Um den Homogenisaten von Gewebereste zu befreien, wurde eine Zentrifugation (Centrifuge 5415C, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln) der Substanz über 3 min bei 10000 U/min durchgeführt. Dem mRNA-reichen

Überstand wurden 350 µl 70% Ethanol zugegeben, um die Bindungseigenschaften der RNA an die im folgenden Schritt verwendete Membran zu verbessern. Anschließend wurden 700 µl dieser Lösung über eine Membran zentrifugiert (15 sec bei 10000 U/min), an welche die RNA gebunden wurde. Die RNA-haltige Membran wurde dreimal durch Zentrifugation (15 sec bei 10000 U/min) gewaschen, davon einmal mit 700 µl RW-1-Puffer und zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer. Durch erneute Zentrifugation (2 min bei 10000 U/min) wurde die Membran getrocknet. Zum Lösen der RNA von der Membran wurde 40 µl Rnase-freies H₂O über die Membran zentrifugiert (1 min bei 10000 U/min).

Die Reinheit der isolierten RNA wurde mittels Gelelektrophorese auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten 1% Agarosegel kontrolliert.

3.6.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Um bei der anschließenden cDNA-Synthese in jeder Probe exakt die gleiche Konzentration an RNA einsetzen zu können, wurde in den Versuchsansätzen die RNA-Konzentration bestimmt. Dies erfolgte photometrisch in einer Präzisionsquarzglasküvette (Suprasil, Fa. Hellma) mit Hilfe eines Thermo-Photometers (Photometer: Genesys 6, Fa. Thermo). Dabei dienten 100 µl Rnase-freies H₂O als Leerwert. Aus der zu untersuchenden Probe wurden 2 µl mit 98 µl Rnase-freiem H₂O verdünnt. Bei 260 nm und 280 nm wurde im Photometer die Absorption gemessen und daraus die RNA-Konzentration errechnet. Ein Hinweis für die Reinheit der RNA-Lösung konnte auch aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) gewonnen werden: Ein Quotient zwischen 1,85-2,1 zeigt eine reine RNA-Lösung an, ein Quotient von 1,8-1,85 ist typisch für DNA, ein Quotient <1,8 ist ein Indiz für eine Verunreinigung der Probe mit Protein.

3.6.3 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Um eine spätere Amplifizierung der Transkripte für die Oberflächenmoleküle zu ermöglichen, mussten aus der mRNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert werden. Dazu wurden je 15,7 µl der verdünnten RNA-Lösungen (entsprechend 2 µg RNA) in Rnase-freien 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen (BiozymDiagnostik, Hess,

Oldendorf) in einem Thermocycler (Px2 Thermal Cycler, Fa. Thermo) bei 75°C inkubiert für 3 min und auf Eis gekühlt. Jede RNA-Probe wurde mit 14,3 µl cDNA-Synthese-Mix: 1 µl 45 µM Oligo p(dT)₁₅-Primer (Fa. Roche Applied Science); 6 µl 5x First-Strand-Buffer (GibcoBRL, Eggenstein); 3 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT, Fa. Roche Applied Science); 1,5 µl 0,5 mM dNTP-Mix (Boehringer, Mannheim) und 2,0 µl 400 U Omniskript RT reverse transcriptase (Fa. Quiagen) versetzt, bei 37°C für 60 min im Thermocycler inkubiert, anschließend zur Inaktivierung des Synthesemixes für 10 min auf 95°C erhitzt.

3.6.4 Amplifizierung der cDNA: PCR

Aus der synthetisierten cDNA wurde nun mittels PCR die spezifische cDNA für CD 11b, CD 18, p22phox, p47phox, p67phox, gp91phox, β-actin und GAPDH amplifiziert.

Hierzu wurden für jeden Ansatz 3 µl der cDNA-Proben mit 47 µl eines PCR-Synthese-Reagenz versetzt. Die Zusammensetzung der PCR-Reagenz war wie folgt: 5 µl 10x-Puffer (Boehringer, Mannheim); 1 µl 0,5 mM dNTP-Mix (Boehringer, Mannheim); 30,8 µl H₂O; 0,2 µl 1 U Taq DNA Polymerase (HotStarTaq DNA Polymerase, Fa. Quiagen), sowie je 5 µl eines sense und antisense Oligonukleotid-Primers (alle MWG-Biotech, Ebersberg, Germany).

Primer-Sequenzen:

| | | |
|-----------------------------|---------|---|
| GAPDH | forward | 5' - ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC - 3' |
| | reverse | 5' - TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA - 3' |
| β-actin | forward | 5' - GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA - 3' |
| | reverse | 5' - CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC - 3' |
| CD 11b (CR3-α chain) | forward | 5' - GCT GTT TAA CAT CAC CAA CGG - 3' |
| | reverse | 5' - TCA TGT CTG AAT CCA CTC TGG - 3' |
| CD 18 (CR3-β chain) | forward | 5' - ATC CTG ACT CCA TTC GCT GC - 3' |

| | | |
|-----------------|---------|-------------------------------------|
| | reverse | 5'- CTC GGT CTG AAA CTG GTT GG - 3' |
| gp91phox | forward | 5'- GCT GTT CAA TGC TTG TGG CT - 3' |
| | reverse | 5'- TCT CCT CAT CAT GGT GCA CA - 3' |
| p22phox | forward | 5'- GTT TGT GTG CCT GCT GGA GT - 3' |
| | reverse | 5'- TGG GCG GCT GCT TGA TGG T - 3' |
| p47phox | forward | 5'- ACC CAG CCA GCA CTA TGT GT - 3' |
| | reverse | 5'- AGT AGC CTG TGA CGT CGT CT - 3' |
| p67phox | forward | 5'- CGA GGG AAC CAG CTG ATA GA - 3' |
| | reverse | 5'- CAT GGG AAC ACT GAG CTT CA - 3' |

Das Reaktionsgemisch wurde in einem PCR-Cycler (Px2 Thermal Cycler, Fa. Thermo) über 1min bei 94°C erhitzt und denaturiert. Die spezifischen Sequenzen wurden mit 28 (GAPDH, β -Actin, und p22phox), 32 (CD 11b und CD 18) oder 35 (gp91phox, p47phox, und p67phox) der folgenden Zyklen amplifiziert: 45 sec Denaturierung bei 94°C, 30 sec Primeranlagerung bei 55°C und 35 sec Kettenverlängerung bei 72°C. Abschließend werden die PCR-Produkte bei 4°C gelagert.

3.6.5 Identifizierung der PCR-Produkte: Gelelektrophorese

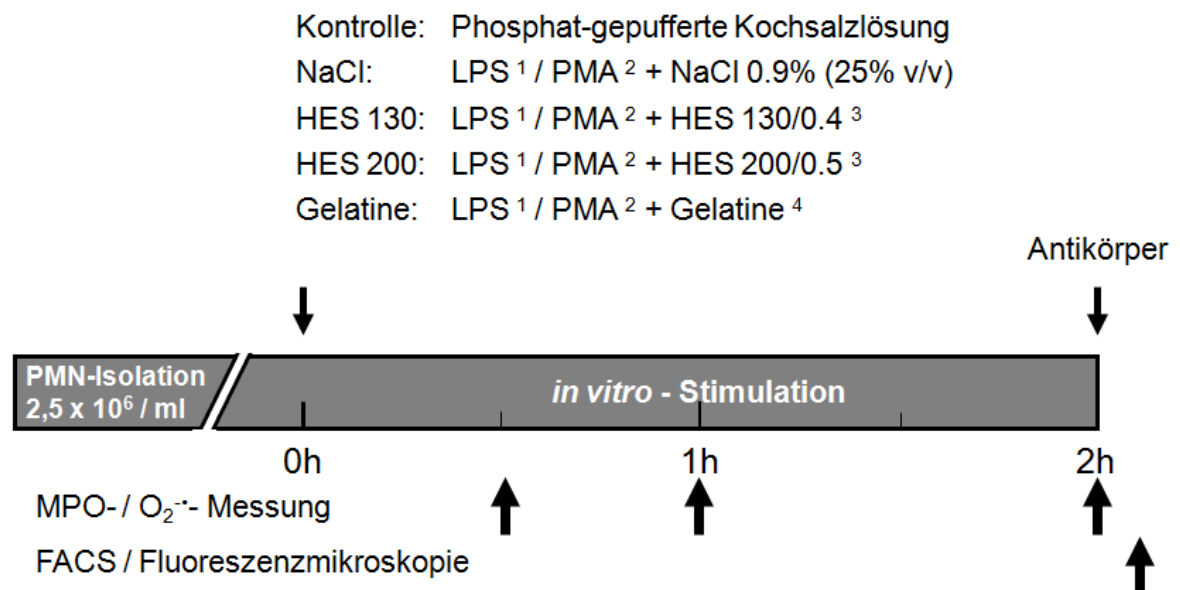
Zur Herstellung des 1% Agarosegels, das für die Gelelektrophorese benötigt wurde, haben wir 83 μ l einer Tris-Acetat-EDTA-Lösung (TAE-Lösung), 333 mg Agarose (Promega, Madison, WI, USA), 1,66 μ l Ethidiumbromid (Promega, Madison, WI, USA) und 33 ml des PCR-Laufpuffers (10 mM Tris; 0,35% Eisessig; 1 mM EDTA) unter Rühren zu einem klaren Gel gekocht. Nach Abkühlen auf 60°C wurde es in eine Elektrophoresekammer eingebracht (Blue Marine 200, Serva, Heidelberg), wo es bis zur vollständigen Polymerisation abkühlte.

In die angelegten Taschen des Agarosegels wurden je 2 µl Loading-Puffer (6x Loading Dye, MBI Fermentas) und 4 µl der jeweiligen PCR-Produkte gegeben. Um die Identifizierung der Produkte möglich zu machen, wurde in den beiden äußersten Taschen je 1 µl eines Molekulargewichtsmarkers (100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas) mit 1 µl Loading-Puffer und mit 4 µl H₂O verdünnt aufgetragen. Das Gel wurde mit PCR-Laufpuffer überschichtet und die Elektrophorese mit 120 V, 70 mA und einer Laufzeit von 25-30 min gestartet. Mittels UV-Licht Visualisierung (Gene Genius Bio Imaging System, Syngene, Cambridge, UK) erfolgte die Identifizierung der spezifischen Banden. Dabei können PCR-Produkte als Banden mittels eines Molekulargewichtsstandards (PCR Marker 50-2000 bp, Novagen, Madison, WI, USA) identifiziert werden. Die Gele wurden abschließend digital dokumentiert.

3.6.6 Quantifizierung der Gelelektrophoresebanden

Durch Messung der Farbdichte wurden die Konzentrationsunterschiede auf den Gelen quantifiziert. Die densitometrische Auswertung der digitalisierten Gele wurde mittels eines Konzentrationsstandards (500 bp DNA Quantitation Standard, ABgene, Epsom, UK) und einer speziellen Software semiquantitativ durchgeführt (Genesnap / Genetools, Syngene, Cambridge, UK).

3.7 Versuchsprotokoll aller Versuchsreihen



¹ LPS: Lipopolysaccharid von E.coli 0111:B4

² PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate

³ HES: Hydroxyethylstärke 20 mg/ml

⁴ Gelatine: Gelatinepolysuccinat 10 mg/ml

Abbildung 4: schematisches Versuchsprotokoll für alle Versuchsreihen

Das Versuchsprotokoll für die Versuche ist in Abbildung 4 dargestellt. Nach Isolation der neutrophilen Granulozyten erfolgte vor jeder Stimulation die Vitalitätskontrolle und die Bestimmung der Zellzahl um in jedem Ansatz die gleichen Bedingungen zu schaffen. Einschlusskriterium für die weitere Verwendung der Zellen nach dem Isolationsvorgang war eine Vitalität von >95% der PMN.

Nach Bestimmung der Ausgangswerte erfolgte eine Randomisierung der Zellen in die einzelnen Gruppen NaCl, HES 130, HES 200 und Gelatine. Die Stimulation erfolgte über zwei Stunden, wurde dann durch Gabe der Ansätze auf Eis

terminiert. Es erfolgte die Auswertung der zu untersuchenden Moleküle nach den in den einzelnen Kapiteln beschriebenen Methoden.

3.8 Applizierte Substanzen

3.8.1 Lipopolysaccharid

Für die Simulation von inflammatorischen Reaktion hat sich sowohl bei in vivo, als auch bei in vitro Versuchen die Gabe von Endotoxinen etabliert. Das in der Literatur häufig beschriebene Endotoxin für die in vitro Stimulation von isolierten neutrophilen Granulozyten ist das LPS (Lipopolysaccharid von E. coli 0111:B4, Sigma, Germany). Das LPS bewirkt durch die Stimulation der Zellen vor allem eine erhöhte Expression von Oberflächenmolekülen, während die Sekretion von intrazellulären Vesikeln nicht so effektiv erfolgt. Wir führten für jedes zu untersuchende Molekül Vorversuche durch, um eine optimale Stimulation zu erreichen. Für die Messung der Expression von Oberflächenmolekülen hatten wir mit LPS die besten Ergebnisse, womit sich die Daten der Literatur bestätigten [12, 29].

3.8.2 Phorbol 12-myristate 13-acetate

Phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma, Germany) (PMA) ist ein Phorboldiester, das in der biomedizinischen Forschung als Aktivator der Proteinkinase C (PKC) und somit als Aktivator für intrazelluläre Mechanismen verwendet wird. Dabei wird die strukturelle Ähnlichkeit der PMA zu einem natürlichen Aktivator der PKC genutzt, dem Diacylglycerol. Das PMA aktiviert die neutrophilen Granulozyten und bewirkt dadurch vor allem eine Exozytose von Vesikeln. In unseren Vorversuchen wurde dies bestätigt, da der Effekt von PMA für die Untersuchung der Sekretion von MPO und der Sauerstoffradikale von Vorteil war [117].

3.8.3 Physiologische Kochsalzlösung

Die physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, B.Braun, Melsungen) ist eine Elektrolytlösung, deren Osmolarität mit 308 mosmol/l sich nahe an der Osmolarität

des Plasmas befindet. Das NaCl 0,9% ist eine Standardsubstanz in dem perioperativen und intensivmedizinischen Volumenmanagement. Es wurde jedem Versuchsansatz in den NaCl-Gruppen 250 µl dieser Substanz beigefügt, so dass die Zellen in der Umgebung inkubiert und stimuliert werden konnten. Als Grundlage jedes Versuchsansatzes und den Kontrollgruppen diene eine phosphatgepufferte Kochsalzlösung [2].

3.8.4 Hydroxyethylstärke

Analog zu dem beschriebenen Versuchsaufbau für die Kochsalzgruppen wurden den jeweiligen HES Gruppen 250 µl der entsprechenden Hydroxyethylstärke-Lösung zugefügt. In der einen Gruppe verwendeten wir das Hydroxyethylstärke (HES), 6% HES 130/0,4 (Voluven, Fresenius Kabi, Germany), eine synthetische Kolloidlösung, die in Deutschland weitverbreitet zum Volumenersatz eingesetzt wird.

In der zweiten HES-Gruppe wurde den Versuchsansätzen 250 µl Hydroxyethylstärke, 10% HES 200/0,5 (HAES steril 10%, Fresenius Kabi, Germany) zugegeben [2].

3.8.5 Gelatine

Zusätzlich zur Kochsalzlösung und den beiden HES-Lösungen untersuchten wir in dieser Studie die Gelatine-Lösung. Die Gelatine-Lösung ist ebenfalls als künstliche Kolloid-Lösung als Volumenersatz in Anästhesiologie und Intensivmedizin einsetzbar. Die Gelatinemoleküle werden aus Kollagen der Rinderhaut und den Rinderknochen gewonnen. Die Moleküle werden zu etwa 80 % renal ausgeschieden, ein geringer Teil wird über den Darm eliminiert oder durch Peptidasen abgebaut. Die von uns verwendete Lösung ist 4% SC-GEL mit einer Molekülgröße von etwa 30 kD.

Der Gelatine-Gruppe wurde, wie in den anderen Gruppen, jedem Versuchsansatz 250 µl der Infusionslösung zugefügt, so dass die PMN in Anwesenheit von Gelatine-Lösung inkubiert und stimuliert wurden [2].

3.9 Statistik

Die Ergebnisse der FACS-Analyse und der photometrischen Untersuchungen wurden in den Tabellen als Mittelwert, Medianwert plus den Quartilsabstand (Q_{25} - Q_{75}) angegeben. In den Grafiken ist ausschließlich der Medianwert mit Quartilsabstand (Q_{25} - Q_{75}) dargestellt. Die statistische Auswertung wurde mittels des Computerprogramms SigmaStat 3.5 (Jandel corporation, Germany) durchgeführt. Es wurden jeweils die Ergebnisse der einzelnen Gruppen untereinander verglichen. Die Varianzanalyse zwischen diesen Gruppen wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test untersucht. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0.05$ festgelegt.

4 Material

4.1 Zellen

Für die durchgeführten Versuche wurden humane neutrophile Granulozyten verwendet, die aus heparinisiertem Vollblut gewonnen wurden. Als Spender des Vollblutes fungierten gesunde, freiwillige, erwachsene Probanden.

4.2 Geräte

FACScan Durchflusszytometrie, Becton Dickinson, Germany

Multiscan microplate spectrophotometer and ScanIt software (both, Thermo Scientific, MA, USA).

Centrifuge 5415C, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln

Thermocycler (Thermocycler Px2, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Thermo-Photometer (Photometer: Genesys 6, Fa. Thermo)

Elektrophoresekammer (Blue Marine 200, Serva, Heidelberg)

UV-Licht Visualisierung (Gene Genius Bio Imaging System, Syngene, Cambridge, UK)

Auswertungssoftware rt-PCR (Genesnap / Genetools, Syngene, Cambridge, UK)

4.3 Reagenzien für die Zellseparation

Heparin 25.000 IE / 5ml, B. Braun Melsungen AG, Germany

Dextran 250.000 MW, 500g, Biomol GmbH, Germany

Ficoll-Lösung (Ficoll-Trennlösung, Dichte 1.077 g/ml; Biochrom, Germany)

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) (DULBECCO, Biochrom, Germany)

Trypanblau-Lösung 0,25%, Serva, Germany

4.4 Stimulation

LPS (Lipopolysaccharid von E. coli 0111:B4), Sigma, Germany

PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate), Sigma, Germany

4.5 Infusionslösungen

physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, B. Braun, Melsungen, Germany)

Hydroxyethylstärke (HES) 6%, HES 130/0,4 (Voluven, Fresenius Kabi, Germany)

Hydroxyethylstärke 10%, HES 200/0,5 (HAES steril 10%, Fresenius Kabi, Germany)

Gelatine 4%, (Gelafundin 40 mg/ml, B. Braun, Melsungen, Germany)

4.6 Antikörper

monoclonal mouse IgG1 antibody to human CD 11b; Acris Antibodies GmbH, Germany

monoclonal mouse IgG1 antibody to human CD 66b; Acris Antibodies GmbH, Germany

monoclonal mouse IgG1 antibody to human Flavocytochrome b₅₅₈; Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Japan

FITC-Monoclonal Rat Anti-Mouse IgG1; Invitrogen Corporation, USA

4.7 MPO-Assay

TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (Sigma, Germany)

HTAB: Hexadecyltrimethylammoniumbromid (Sigma, Germany)

H₂O₂: Wasserstoffperoxid 30%, Perhydrol (Merck, Germany)

DMSO: Dimethylsulfoxid (Merck, Germany)

Merrettich-Peroxidase: Peroxidase from horseradish, 5000 U (Sigma, Germany)

Kalium-Phosphat-Puffer 0,1M, pH 6,0:

- KH_2PO_4 wasserfrei: Kaliumdihydrogenphosphat 0,681 g / 50 ml H_2O (Merck, Germany)
- K_2HPO_4 wasserfrei: Dikaliumhydrogenphosphat 0,871 g / 50 ml H_2O (Merck, Germany)
- KH_2PO_4 (ca. 30 ml) mit K_2HPO_4 (ca. 3,5 ml) auf pH 6,0 einstellen (Merck, Germany)

Natrium-Phosphat-Puffer 0,08 M, pH 5,4:

- NaH_2PO_4 wasserfrei: Natriumdihydrogenphosphat 0,960 g / 100 ml H_2O (Merck, Germany)
- Na_2HPO_4 wasserfrei: Dinatriumhydrogenphosphat 1,136 g / 100 ml H_2O (Merck, Germany)
- NaH_2PO_4 (ca. 30 ml) mit Na_2HPO_4 (ca. 1,2 ml) auf pH 5,4 einstellen (Merck, Germany)

Kalium-Phosphat-Puffer 0,05 M, pH 6,0:

- KH_2PO_4 wasserfrei: Kaliumdihydrogenphosphat 0,681 g / 100 ml H_2O (Merck, Germany)
- K_2HPO_4 wasserfrei: Dikaliumhydrogenphosphat 0,871 g / 100 ml H_2O (Merck, Germany)
- KH_2PO_4 (ca. 60 ml) mit K_2HPO_4 (ca. 7 ml) auf pH 5,4 einstellen (Merck, Germany)

4.8 Superoxidanionen-Assay

Cytochrom C from equine heart, 100 mg, Sigma

SOD: Superoxide dismutase from bovine erythrocytes, 30,000 U, Sigma

4.9 rt-PCR

Rneasy Mini Kit (Quaigen, Hilde)

PCR-Reaktionsgefäßen (BiozymDiagnostik, Hess, Oldendorf)

45 µM Oligo p(dT)₁₅-Primer (Fa. Roche Applied Science)

5x First-Strand-Buffer (GibcoBRL, Eggenstein)

0,1 M Dithiothreitol (DTT, Fa. Roche Applied Science)

0,5 mM dNTP-Mix (Boehringer, Mannheim)

400 U Omniskript RT reverse transcriptase (Fa. Quiagen)

PCR-Reagenz:

- 10x-Puffer (Boehringer, Mannheim)
- 0,5 mM dNTP-Mix (Boehringer, Mannheim)
- 1 U Taq DNA Polymerase (HotStarTaq DNA Polymerase, Fa. Quiagen)
- antisense Oligonukleotid-Primers (alle MWG-Biotech, Ebersberg, Germany)

Primer-Sequenzen (alle MWG-Biotech, Ebersberg, Germany):

| | | |
|-----------------------------|---------|--|
| GAPDH | forward | 5' - ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC - 3' |
| | reverse | 5' - TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA - 3' |
| β-actin | forward | 5' - GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA - 3' |
| | reverse | 5' - CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC- 3' |
| CD 11b (CR3-α chain) | forward | 5' - GCT GTT TAA CAT CAC CAA CGG - 3' |
| | reverse | 5' - TCA TGT CTG AAT CCA CTC TGG - 3' |
| CD 18 (CR3-β chain) | forward | 5' - ATC CTG ACT CCA TTC GCT GC - 3' |
| | reverse | 5' - CTC GGT CTG AAA CTG GTT GG - 3' |
| gp91phox | forward | 5' - GCT GTT CAA TGC TTG TGG CT - 3' |
| | reverse | 5' - TCT CCT CAT CAT GGT GCA CA - 3' |
| p22phox | forward | 5' - GTT TGT GTG CCT GCT GGA GT - 3' |
| | reverse | 5' - TGG GCG GCT GCT TGA TGG T - 3' |
| p47phox | forward | 5' - ACC CAG CCA GCA CTA TGT GT - 3' |
| | reverse | 5' - AGT AGC CTG TGA CGT CGT CT - 3' |
| p67phox | forward | 5' - CGA GGG AAC CAG CTG ATA GA - 3' |

| | | |
|--|---------|-------------------------------------|
| | reverse | 5'- CAT GGG AAC ACT GAG CTT CA - 3' |
|--|---------|-------------------------------------|

Agarosegel:

- Tris-Acetat-EDTA-Lösung (TAE-Lösung, Promega, Madison, WI, USA),
- Agarose (Promega, Madison, WI, USA)
- Ethidiumbromid (Promega, Madison, WI, USA)
- PCR-Laufpuffers (10 mM Tris; 0,35% Eisessig; 1 mM EDTA)

Loading-Puffer (6x Loading Dye, MBI Fermentas)

Molekulargewichtsmarker (100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas)

Molekulargewichtsstandard (500 bp DNA Quantitation Standard, ABgene, Epsom, UK)

5 Ergebnisse

5.1 Durchflusszytometrie

5.1.1 Vorversuche

Um eine größtmögliche Aussagekraft der Versuche zu erreichen, wurde ein Vorversuch durchgeführt, der die optimale Dosis eines Stimulans festlegen sollte, um eine maximale Expression der zu untersuchenden Oberflächenmoleküle zu erzielen. Außerdem sollte eine geeignete Verdünnung für die eingesetzten Antikörper gefunden werden. Es wurde zur Stimulation LPS in Konzentrationen zwischen 20 µg/ml bis 1000 µg/ml, das PMA in Konzentrationen zwischen 10 ng/ml und 500 ng/ml sowie die Kombination der beiden verwendet. (s. Tab. 6) Die Antikörper gegen das jeweilige Oberflächenmolekül wurden in drei verschiedenen Verdünnungen, 1:250, 1: 500, 1:750, getestet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle unten aufgeführt. Der Versuch zeigte, dass eine Stimulation mit LPS 100 µg/ml eine optimale Wirkung erzielt ohne die Zellen zu schädigen. Die Verdünnung der Antikörper in einem Verhältnis von 1:500 ergab das beste Ergebnis.

| Gruppe Antikörperverdünnung | 1:250 | 1:500 | 1:750 |
|---|-------|-------|-------|
| LPS ¹ 20 µg/ml | 33,4 | 52,6 | 47,5 |
| LPS ¹ 100 µg/ml | 23,0 | 51,8 | 49,7 |
| LPS ¹ 200 µg/ml | 10,3 | 41,6 | 34,8 |
| LPS ¹ 1000 µg/ml | 15,6 | 46,1 | 34,7 |
| PMA ² 10 ng/ml | 26,2 | 61,0 | 54,7 |
| PMA ² 50 ng/ml | 80,3 | 85,7 | 81,0 |
| PMA ² 200 ng/ml | 84,2 | 87,9 | 97,5 |
| PMA ² 500 ng/ml | 78,0 | 85,1 | 84,4 |
| LPS ¹ 20 µg/ml + PMA ² 10 ng/ml | 29,6 | 50,4 | 49,8 |

| | | | |
|---|------|------|------|
| LPS ¹ 100 µg/ml + PMA ² 50 ng/ml | 56,3 | 63,4 | 51,7 |
| LPS ¹ 200 µg/ml + PMA ² 100 ng/ml | 62,7 | 64,5 | 49,9 |

Tabelle 6: Ergebnis Dosisfindung für FACS-Analyse

5.1.2 Autofluoreszenz

Der erste Versuchsansatz wurde ohne den ersten Antikörper durchgeführt, um eventuelle unspezifische Bindungen des zweiten Antikörpers gegen die neutrophilen Granulozyten auszuschließen. Es wurde nach dem gleichen Versuchsaufbau wie für die FACS-Messungen die Zellen nach der Stimulationszeit von 2h gemessen, ohne den ersten Antikörper gegen einen der zu untersuchenden Oberflächenmoleküle hinzuzugeben. Das Ergebnis ist in der Abbildung unten dargestellt (Abb. 5). Die Punkte unterhalb der gestrichelten Linie sind Granulozyten, die keine fluoreszierenden Antikörper auf der Oberfläche gebunden haben. Eine Autofluoreszenz konnte ausgeschlossen werden.

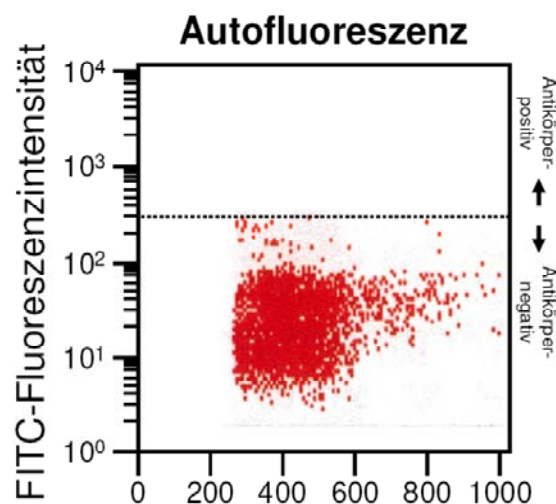


Abbildung 5: dargestellt ist ein dot-plot Diagramm mit der Messung zum Ausschluss der Autofluoreszenz der Leukozyten

5.1.3 CD 11b - Expression

Im Anschluss wurden die Messungen für die Expression von CD 11b auf den neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Nach einer zweistündigen Stimulationszeit wurden pro Probe 10.000 PMN auf Antikörper untersucht, die an den Oberflächenmolekülen gebunden waren. Das FACScan[®] hat die Messdaten zum einen als dot-plot Diagramm (s. Abb. 6 exemplarisch) dargestellt, zum anderen den durch Antikörper markierten Teil prozentual von der gesamt-gemessenen Anzahl der Leukozyten angegeben. (s. Tab. 7)

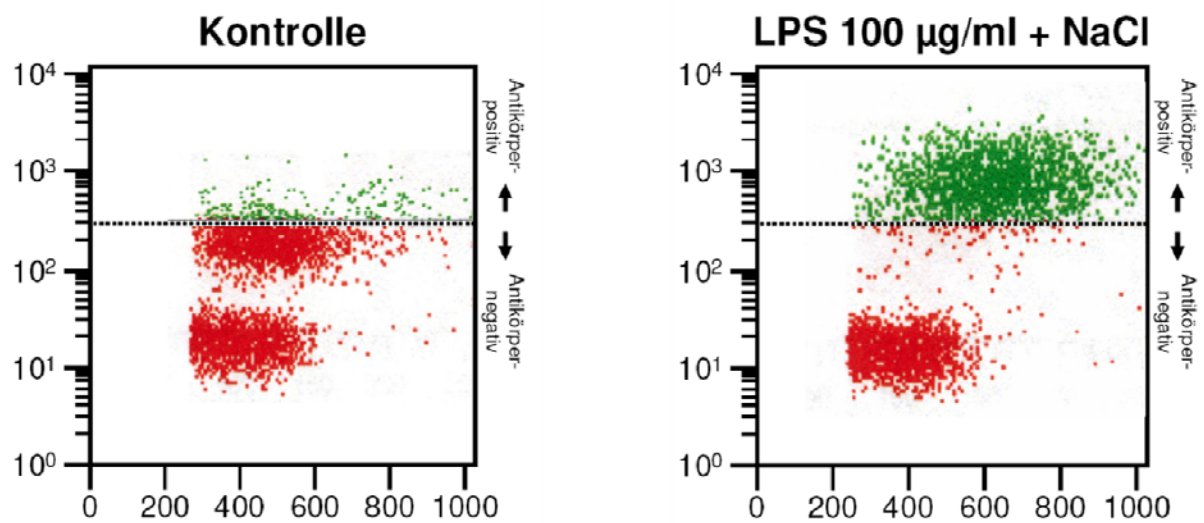


Abbildung 6: dot-plot Diagramm von PMN, links unstimuliert, rechts nach Gabe von LPS, grün dargestellte sind die mit dem FITC Antikörper markierten Zellen

| | n | Mittelwert | SEM | Median |
|---------------------------|----------|-------------------|------------|---------------|
| 1. Neg. Kontrolle | 9,0 | 20,1 | 3,3 | 18,7 |
| 2. Pos. Kontrolle | 9,0 | 45,1 | 5,4 | 55,0 |
| 3. NaCl | 8,0 | 16,6 | 3,1 | 17,5 |
| 4. HES 130 | 9,0 | 11,8 | 3,5 | 8,9 |
| 5. HES 200 | 9,0 | 14,1 | 2,5 | 13,6 |
| 6. Gelatine | 9,0 | 55,6 | 6,2 | 63,3 |
| 7. LPS + NaCl | 8,0 | 46,1 | 4,3 | 49,8 |
| 8. LPS + HES 130 | 8,0 | 29,8 | 4,9 | 28,3 |
| 9. LPS + HES 200 | 8,0 | 41,8 | 4,1 | 40,9 |
| 10. LPS + Gelatine | 8,0 | 62,5 | 3,9 | 65,0 |

Tabelle 7: im FACScan gemessene Granulozyten mit gebundenen Antikörpern am CD 11b – Rezeptor in Prozent von der gesamt-gemessenen Anzahl an Granulozyten

Es wurden acht, bzw. neun Messungen pro Versuchsansatz durchgeführt. In der Tabelle 7 und in der Abbildung 7 sind der jeweilige Mittelwert, die Standardabweichung und der Medianwert aufgeführt. Aus den Daten ist zu erkennen, dass in der ersten Gruppe, in der die Zellen nicht stimuliert wurden, in geringem Maße Antikörper an die Oberflächenmoleküle der Leukozyten binden. Im Vergleich dazu wurde in der Positivkontrolle ein signifikanter Anstieg der Antikörperbindung und somit der Expression des CD 11b gemessen. Dieses bestätigte, dass die PMN vital und durch die Gabe des LPS adäquat stimulierbar waren, sodass eine gesteigerte Expression der Oberflächenmoleküle gemessen werden konnte. Die Gruppen 3 - 5, die NaCl -, HES 130 - und HES 200 - Gruppen ohne Stimulans zeigten keine Veränderung bezüglich der CD 11b Expression. Die Gruppe 6, die Gelatine – Gruppe, zeigte bereits ohne Stimulation eine erhöhte Antikörperbindung. In den Gruppen 7, 9 + 10, die Gruppen LPS + NaCl, LPS + HES 200 und LPS + Gelatine wurde eine signifikant höhere Bindung der Antikörper im Vergleich zu der Negativkontrolle gemessen. Dagegen konnte in der

Gruppe LPS + HES 130 kein signifikanter Anstieg der Expression von dem Adhäsionsmolekül gegenüber der Negativkontrolle festgestellt werden.

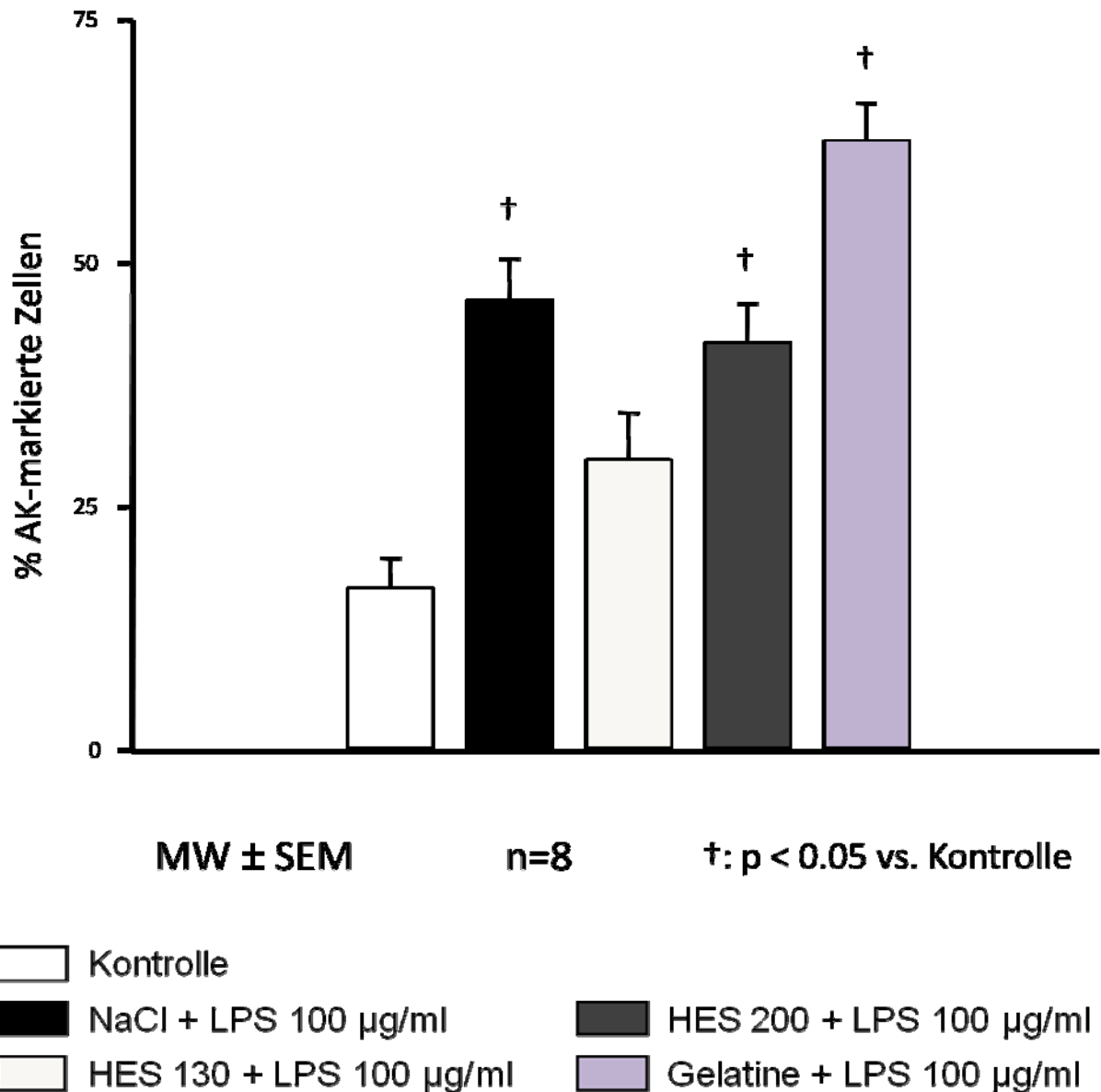


Abbildung 7: Ergebnis CD 11b - Expression im MW + SEM

5.1.4 CD 66b - Expression

In der Tabelle 8 und der Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Messungen der CD 66b - Adhäsionsmoleküle dargestellt. Auch hier zeigte sich in der Positivkontrolle ein signifikanter Anstieg der CD 66b Expression und somit die Bestätigung der Vitalität und der Stimulierbarkeit der PMN. Es zeigte sich außer in der Gelatine Gruppe in keiner der Gruppen ohne die Zugabe des Stimulans eine Veränderung der Expression gegenüber der Negativkontrolle. Nach zweistündiger Stimulation waren in den Gruppen 7 (LPS + NaCl) + 10 (LPS + Gelatine) eine signifikant höhere Expression des CD 66 b Moleküls zu messen, als in der Negativkontrolle. In den Gruppen 8 (LPS + HES 130) + 9 (LPS + HES 200) zeigte sich dagegen keine erhöhte Expression des Moleküls.

| | n | Mittelwert | SEM | Median |
|---------------------------|-----|-------------|------------|-------------|
| 1. Neg. Kontrolle | 6,0 | 19,1 | 3,9 | 14,5 |
| 2. Pos. Kontrolle | 6,0 | 45,4 | 6,2 | 40,0 |
| 3. NaCl | 6,0 | 19,4 | 4,2 | 16,2 |
| 4. HES 130 | 6,0 | 12,6 | 3,5 | 9,8 |
| 5. HES 200 | 6,0 | 13,6 | 4,5 | 11,6 |
| 6. Gelatine | 6,0 | 52,0 | 2,1 | 52,3 |
| 7. LPS + NaCl | 6,0 | 40,3 | 5,9 | 35,4 |
| 8. LPS + HES 130 | 6,0 | 27,0 | 5,0 | 22,4 |
| 9. LPS + HES 200 | 6,0 | 41,9 | 5,9 | 39,1 |
| 10. LPS + Gelatine | 6,0 | 50,8 | 4,9 | 56,0 |

Tabelle 8: im FACScan gemessene Granulozyten mit gebundenen Antikörpern am CD 66b – Rezeptor in Prozent von der gesamt-gemessenen Anzahl an Granulozyten

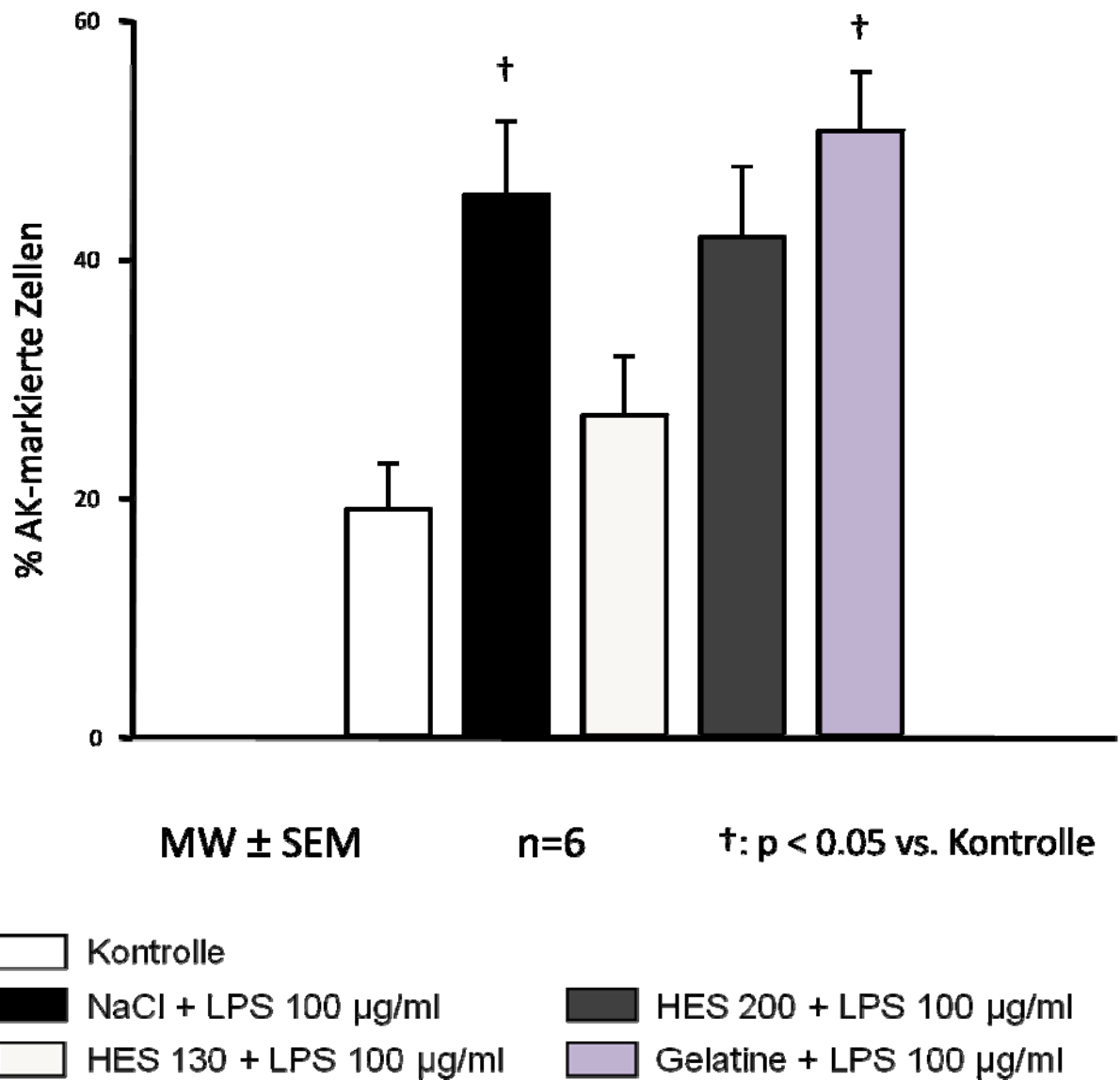


Abbildung 8: Ergebnis CD 66b - Expression im MW + SEM

5.1.5 Cytochrom b_{558} - Expression

Die Tabelle 9 und die Abbildung 9 zeigen die Ergebnisse zur Messung der Expression des Flavocytochrome b_{558} . Die Negativkontrolle zeigt nur ein sehr geringes Maß an Bindung des Antikörpers. In der Positivkontrolle hingegen hatten die PMN signifikant mehr Antikörper gebunden. Die neutrophilen Granulozyten in der Gruppe LPS + HES 130 zeigten keine signifikant höhere Expression als die in der Negativkontrolle. Dagegen zeigten die Granulozyten in den Gruppen LPS + NaCl, LPS + HES 200, LPS + Gelatine eine signifikant höhere Expression als die in der Negativkontrolle. In den Gruppen LPS + HES 200 und LPS + Gelatine war die Expression des Cytochrom b_{558} im Vergleich zur Gruppe LPS + HES 130 signifikant höher.

| | n | Mittelwert | SEM | Median |
|---------------------------|-----|-------------|------------|-------------|
| 1. Neg. Kontrolle | 6,0 | 14,8 | 2,0 | 14,5 |
| 2. Pos. Kontrolle | 6,0 | 26,6 | 2,5 | 26,8 |
| 3. NaCl | 6,0 | 13,0 | 1,0 | 13,2 |
| 4. HES 130 | 6,0 | 6,2 | 1,4 | 5,5 |
| 5. HES 200 | 6,0 | 19,2 | 1,1 | 19,6 |
| 6. Gelatine | 6,0 | 48,3 | 3,3 | 51,9 |
| 7. LPS + NaCl | 6,0 | 25,9 | 2,9 | 26,3 |
| 8. LPS + HES 130 | 6,0 | 20,0 | 1,9 | 20,9 |
| 9. LPS + HES 200 | 6,0 | 31,0 | 1,7 | 31,1 |
| 10. LPS + Gelatine | 6,0 | 43,5 | 1,6 | 44,9 |

Tabelle 9: im FACScan gemessene Granulozyten mit gebundenen Antikörpern am Flavocytochrom b_{558} in Prozent von der gesamt-gemessenen Anzahl an Granulozyten

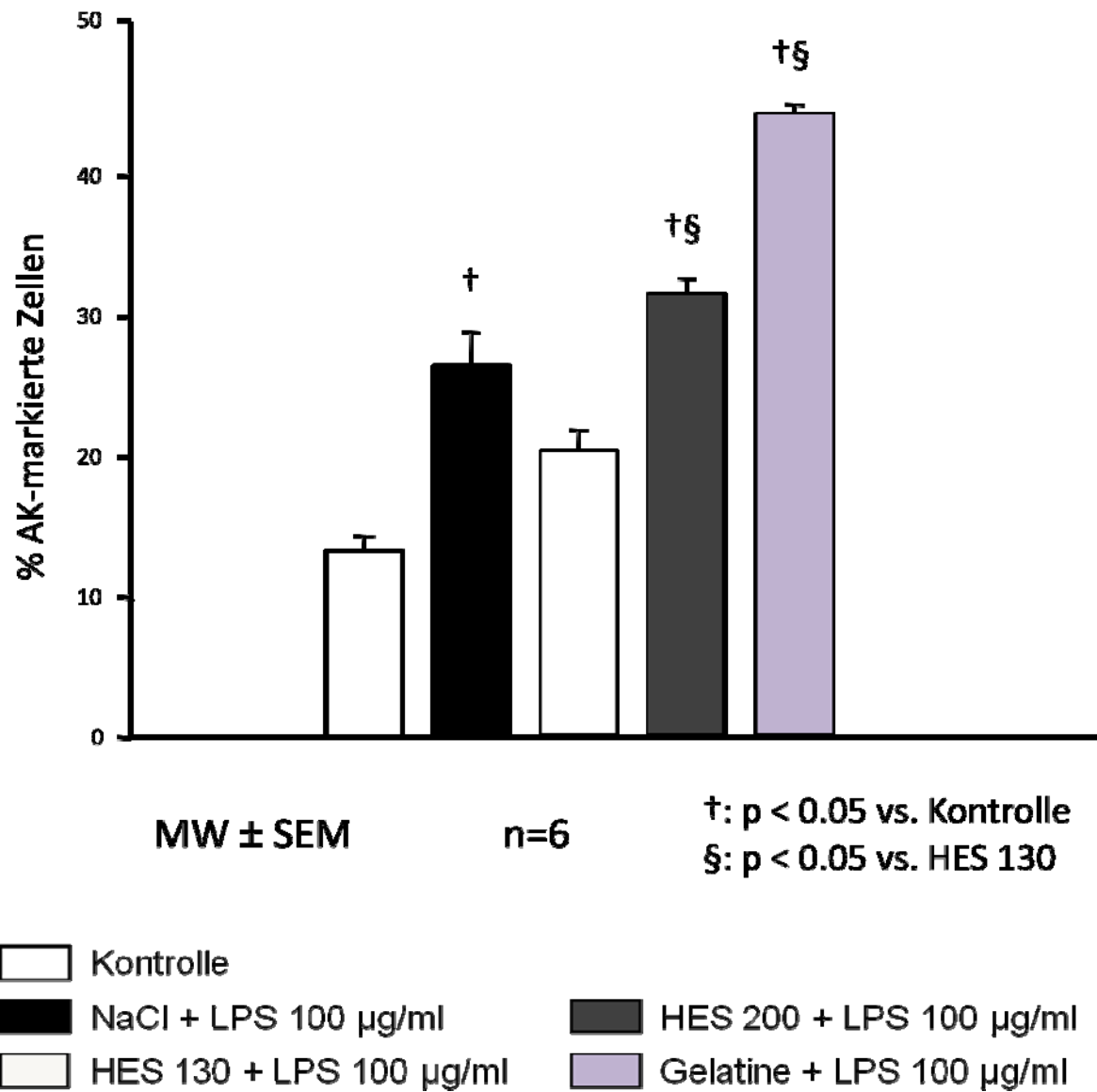


Abbildung 9: Ergebnis Flavocytochrom b_{558} - Expression im MW + SEM

5.2 Myeloperoxidase – Essay

5.2.1 Vorversuche

Für die Versuchsreihe zur Messung der Myeloperoxidasekretion wurde ebenfalls eine Versuchsreihe zur Dosisfindung des geeigneten Stimulans durchgeführt. Da in der Literatur beschrieben ist, dass PMA zu einer ausgeprägten Exozytose führt, wurde diese Substanz in jedem Ansatz verwendet. In einigen Ansätzen wurde die Kombination von PMA + LPS untersucht. Die Ergebnisse der Messung sind in der Tabelle 10 aufgeführt. Es wurden die Bedingungen der Versuchsreihe hergestellt, in dem für jedes zu untersuchende Stimulans vier Ansätze gemacht wurden. Eines diente als Kontrollansatz, den anderen wurden die Medien NaCl, HES 130 und HES 200 zugefügt. In allen Ansätzen war eine Stimulation der Zellen und eine Sekretion der Myeloperoxidase zu sehen. In den Ansätzen 9 - 12, in denen ausschließlich mit PMA stimuliert wurde, zeigte sich eine homogene Zunahme der Sekretion über die gemessene Zeit von zwei Stunden, so dass wir uns für die Stimulationsdosis 200 ng/ml entschieden.

| | Dosis | Substanz | 30 min | 60 min | 120 min |
|---------------------|-----------------------|----------------|--------|------------|---------|
| 1. LPS + PMA | 200 µg/ml + 100 ng/ml | | 8,62 | 9,09 | 51,23 |
| 2. LPS + PMA | 200 µg/ml + 100 ng/ml | NaCl | 19,66 | 19,40 | 85,47 |
| 3. LPS + PMA | 200 µg/ml + 100 ng/ml | HES 130 | 36,07 | 11,90 | 387,39 |
| 4. LPS + PMA | 200 µg/ml + 100 ng/ml | HES 200 | 17,35 | 14,87 | 32,25 |
| 5. LPS + PMA | 200 µg/ml + 200 ng/ml | | 7,23 | 6,28 | 70,31 |
| 6. LPS + PMA | 200 µg/ml + 200 ng/ml | NaCl | 9,98 | 19,93 | 99,59 |
| 7. LPS + PMA | 200 µg/ml + 200 ng/ml | HES 130 | 14,04 | 10,25 | 44,81 |
| 8. LPS + PMA | 200 µg/ml + 200 ng/ml | HES 200 | 14,78 | 357,6 6 | 54,19 |
| 9. PMA | 200 ng/ml | | 3,70 | 6,43 | 102,73 |
| 10. PMA | 200 ng/ml | NaCl | 9,77 | 19,43 | 150,74 |
| 11. PMA | 200 ng/ml | HES 130 | 17,74 | 9,48 | 76,40 |

| | | | | | |
|----------------|-----------|----------------|-------|-------|-------|
| 12. PMA | 200 ng/ml | HES 200 | 20,32 | 12,23 | 52,65 |
|----------------|-----------|----------------|-------|-------|-------|

Tabelle 10: Dosisfindung für MPO-Messung, MPO-Aktivität [mU/l]

5.2.2 MPO – Messung

Die Ergebnisse der Messung der Myeloperoxidasesekretion sind in der Tabelle 11 und Abbildung 10 zusammengefasst. Aufgeführt sind die Gruppen Negativkontrolle, LPS + NaCl, LPS + HES 130, LPS + HES 200 und LPS + Gelatine. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung für die Messung der MPO-Sekretion nach 120 Minuten. Die Einheit der sezernierten MPO ist mU/l, skaliert ist der Graph logarithmisch. In der Negativkontrolle ist kaum MPO messbar. Die Positivkontrolle dagegen zeigt eine signifikante Steigerung der Sekretion. In den Gruppen LPS + NaCl und LPS + Gelatine war eine signifikant höhere MPO-Sekretion nachweisbar als in der Negativkontrolle. Die Gruppe LPS + Gelatine zeigte ebenfalls eine signifikant gesteigerte MPO Sekretion im Vergleich zur LPS + HES 130 Gruppe. Die Gruppen LPS + HES 130 und LPS + HES 200 zeigen dagegen keine signifikante Steigerung der MPO Sekretion.

| | n | Mittelwert | SEM | Median |
|--------------------------|----------|-------------------|-------------|---------------|
| 1. Neg. Kontrolle | 8,0 | 12,0 | 2,3 | 13,2 |
| 2. Pos. Kontrolle | 8,0 | 134,5 | 14,2 | 120,7 |
| 3. PMA + NaCl | 8,0 | 114,4 | 25,2 | 103,6 |
| 4. PMA + HES 130 | 8,0 | 49,5 | 10,4 | 41,7 |
| 5. PMA + HES 200 | 8,0 | 36,2 | 8,6 | 35,8 |
| 6. PMA + Gelatine | 8,0 | 780,3 | 61,8 | 815,2 |

Tabelle 11: MPO-Aktivität [mU/l] in vitro stimulierter PMN nach 120 Min.

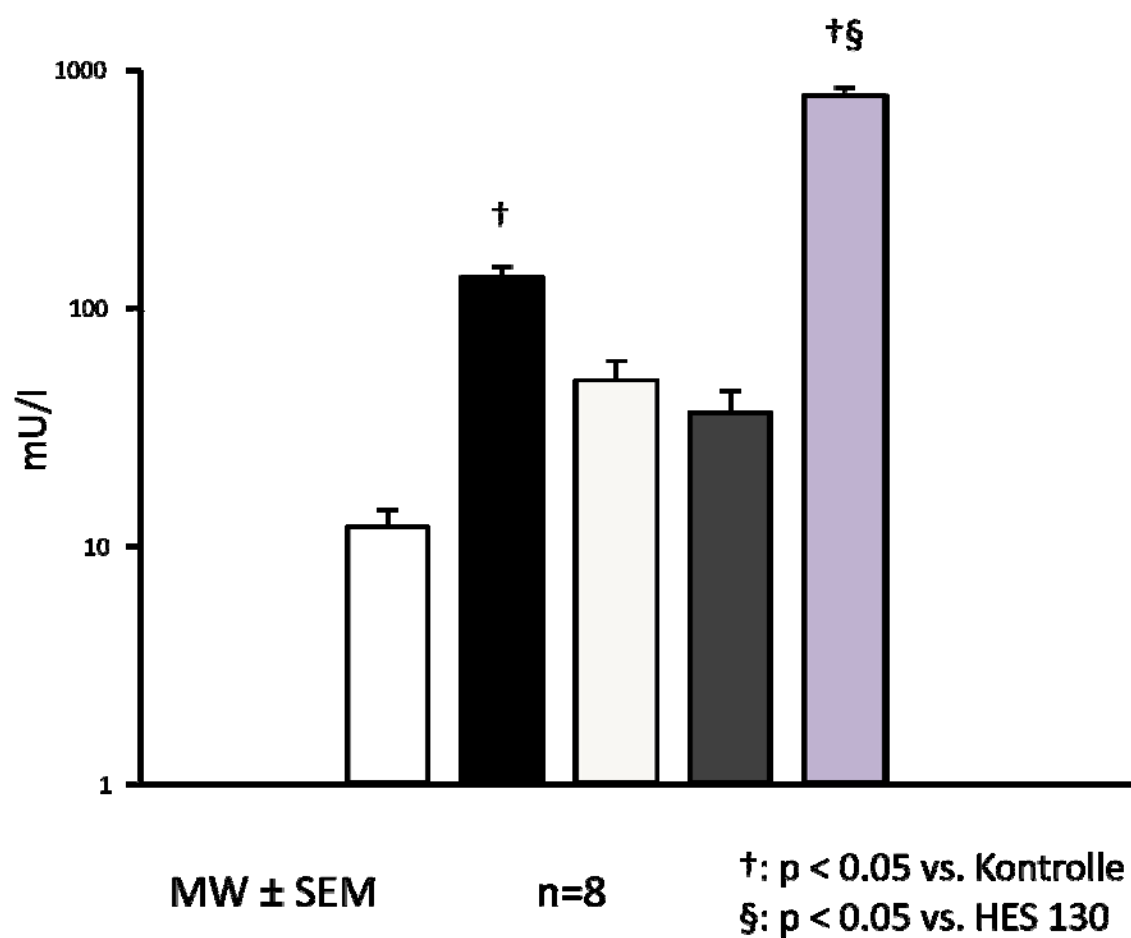


Abbildung 10: 11MPO-Aktivität [mU/l] in vitro stimulierter PMN nach 120 Min.

5.3 Superoxidanionen – Essay

5.3.1 Vorversuche

Für die Findung der Dosis zur Stimulation der PMN, die zu einer guten Sekretion von Sauerstoffradikalen führte, haben wir verschiedene Konzentrationen von LPS und PMA, s. Tabelle 12, verglichen. Die Messungen erfolgten nach 30 min, 60 min und 120 min. Nach Stimulation der Leukozyten durch LPS konnte nur eine unzureichende Sekretion der O_2^- Radikale erreicht werden. Dagegen zeigte sich nach Stimulation durch PMA eine ausgeprägte Ausschüttung der Radikale. Die Gruppe PMA 20 ng/ml zeigte die beste Zunahme des O_2^- Radikalgehalts in den Proben.

| | Dosis | 30 min | 60 min | 120 min |
|---------------------|----------------|--------|--------|---------|
| 1. Kontrolle | | 0,00 | 0,70 | 0,00 |
| 2. PMA | 2 ng/ml | 0,95 | 1,59 | 1,90 |
| 3. PMA | 20 ng/ml | 10,35 | 29,78 | 51,17 |
| 4. PMA | 50 ng/ml | 41,97 | 53,97 | 49,71 |
| 5. PMA | 100 ng/ml | 52,38 | 55,37 | 49,52 |
| 6. PMA | 200 ng/ml | 52,25 | 54,22 | 45,59 |
| 7. LPS | 2 μ g/ml | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 8. LPS | 20 μ g/ml | 0,00 | 0,89 | 0,13 |
| 9. LPS | 50 μ g/ml | 0,00 | 1,84 | 12,57 |
| 10. LPS | 100 μ g/ml | 0,00 | 0,00 | 19,68 |
| 11. LPS | 200 μ g/ml | 1,02 | 4,38 | 30,73 |

Tabelle 12: Dosisfindung zur Stimulation der PMN, um die Sekretion von O_2^- Radikalen zu messen; Angegeben sind Superoxidanionen in μ mol/ 10^6 Zellen

5.3.2 SOD – Messung

In der unten aufgeführten Tabelle 13 und der Abbildung 11 sind die Ergebnisse der photometrischen Messung der Sekretion der Superoxidanionen nach 120 Minuten Stimulationszeit aufgeführt. In den Gruppen 1, 3-6 sind die Versuchsansätze ohne Zugabe des Stimulans. Die Ergebnisse in diesen Gruppen zeigten so gut wie keine Sekretion der O_2^- - Radikale. In der 2. Gruppe als Positivkontrolle sahen wir eine signifikant höhere Superoxidanionenkonzentration als in der Negativkontrolle. Die Zellen waren somit vital und ließen sich gut stimulieren. In den Gruppen 7 – 10 sind die Versuchsansätze unter Zugabe des PMA als Stimulans. Es wurde in allen Gruppen eine signifikant höhere Sekretion der Sauerstoffradikale im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen.

| | n | Mittelwert | SEM | Median |
|---------------------------|-----|------------|-----|--------|
| 1. Neg. Kontrolle | 5,0 | 0,6 | 0,3 | 0,1 |
| 2. Pos. Kontrolle | 5,0 | 46,3 | 3,4 | 49,3 |
| 3. NaCl | 5,0 | 0,6 | 0,2 | 0,8 |
| 4. HES 130 | 5,0 | 0,3 | 0,1 | 0,1 |
| 5. HES 200 | 5,0 | 0,5 | 0,2 | 0,6 |
| 6. Gelatine | 5,0 | 1,4 | 0,5 | 1,1 |
| 7. PMA + NaCl | 5,0 | 46,9 | 3,0 | 47,9 |
| 8. PMA + HES 130 | 5,0 | 48,4 | 0,9 | 47,7 |
| 9. PMA + HES 200 | 5,0 | 48,4 | 1,6 | 50,5 |
| 10. PMA + Gelatine | 5,0 | 51,3 | 1,8 | 52,3 |

Tabelle 13: Ergebnisse zur SOD-Messung, angegeben sind Superoxidanionen in $\mu\text{mol}/10^6$ Zellen nach 120 Min.

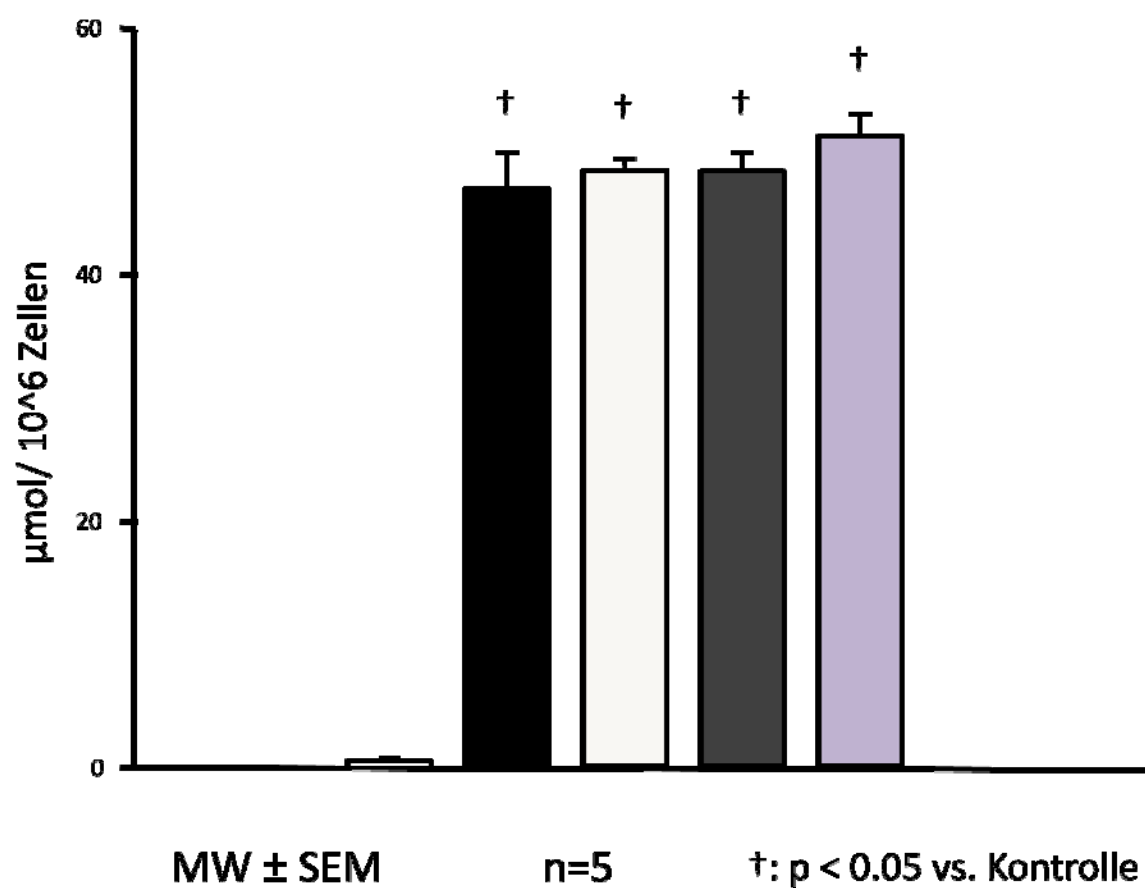


Abbildung 11: Ergebnisse zur SOD-Messung, angegeben sind Superoxidanionen in $\mu\text{mol}/10^6$ Zellen nach 120 Min.

5.4 rt-PCR Untersuchung

Die Ergebnisse der Analyse der Gentranskription, die mit der rt-PCR gemessen wurden, sind in Tabelle 14 dargestellt. Die Leukozyten wurden in den verschiedenen Gruppen über zehn Stunden stimuliert. In den Versuchen diente die Messung der Expression von GAPDH und β -Actin zur internen Kontrolle, da diese in allen Gruppen durch die Stimulation nicht verändert wurden. Wir bildeten eine Kontrollgruppe, in der die Zellen über den Zeitraum von 10h ohne Zugabe von LPS inkubiert wurden. Diese Gruppe diente als Negativkontrolle und Vergleichsgruppe. Die Ergebnisse der NaCl-Gruppe zeigte signifikante Anstiege der Expression von CD 11b und CD 18, sowie von gp91phox, p47phox und p67phox, welche Untergruppen der NADPH-Oxidase sind, gegenüber der Expression in der Kontrollgruppe ohne Stimulation. In der HES 130-Gruppe kam es nur bei einem Oberflächenmolekül, dem CD 18, zu einem signifikantem Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei dem gp91phox kam es sogar zu einer signifikant niedrigeren Expression als in der NaCl-Gruppe. Die rt-PCR Ergebnisse der HES 200-Gruppe zeigten nur beim CD 11b, CD 18 und dem p47phox eine signifikante Erhöhung der Gentranskription im Gegensatz zur Kontrollgruppe.

| Kontrolle | Zyklen | 10h | p value |
|-------------------------------------|--------|---------------------------|---------|
| GAPDH [$\mu\text{g/ml}$] | 28 | 12.7 (9.7 - 23.7) | |
| β -actin [$\mu\text{g/ml}$] | 28 | 23.9 (21.0 - 26.3) | |
| CD 11b [$\mu\text{g/ml}$] | 32 | 0.0 (0.0 - 0.0) | |
| CD 18 [$\mu\text{g/ml}$] | 32 | 12.9 (9.6 - 13.6) | |
| gp91phox [$\mu\text{g/ml}$] | 35 | 66.6 (55.3 - 91.2) | |
| p22phox [$\mu\text{g/ml}$] | 28 | 7.6 (1.3 - 12.4) | |
| p47phox [$\mu\text{g/ml}$] | 35 | 50.9 (43.8 - 52.7) | |
| p67phox [$\mu\text{g/ml}$] | 35 | 45.5 (8.6 - 75.7) | |

| NaCl-Gruppe | | 10h | p value |
|-------------------------|----|------------------------------|----------------|
| GAPDH [µg/ml] | 28 | 20.9 (16.5 - 27.5) | n.s. |
| β-actin [µg/ml] | 28 | 29.6 (24.8 - 44.7) | n.s. |
| CD 11b [µg/ml] | 32 | 7.5 (5.7 - 9.9) | 0.009 † |
| CD 18 [µg/ml] | 32 | 47.9 (38.8 - 55.9) | < 0.001 † |
| gp91phox [µg/ml] | 35 | 117.2 (115.3 - 123.2) | 0.001 † |
| p22phox [µg/ml] | 28 | 15.7 (10.9 - 20.3) | n.s. |
| p47phox [µg/ml] | 35 | 104.0 (68.1 - 118.5) | 0.014 † |
| p67phox [µg/ml] | 35 | 144.8 (96.6 - 154.8) | 0.031 † |
| HES 130 - Gruppe | | 10h | p value |
| GAPDH [µg/ml] | 28 | 10.7 (6.8 - 15.2) | n.s. |
| β-actin [µg/ml] | 28 | 23.3 (15.1 - 35.5) | n.s. |
| CD 11b [µg/ml] | 32 | 4.4 (3.2 - 9.0) | n.s. |
| CD 18 [µg/ml] | 32 | 29.5 (25.6 - 46.1) | 0.028 † |
| gp91phox [µg/ml] | 35 | 83.7 (73.7 - 89.8) | 0.022 ‡ |
| p22phox [µg/ml] | 28 | 8.9 (5.1 - 11.4) | n.s. |
| p47phox [µg/ml] | 35 | 80.5 (65.1 - 105.5) | n.s. |
| p67phox [µg/ml] | 35 | 108.0 (82.2 - 113.3) | n.s. |
| HES 200 - Gruppe | | 10h | p value |
| GAPDH [µg/ml] | 28 | 16.9 (9.0 - 24.7) | n.s. |
| β-actin [µg/ml] | 28 | 30.8 (18.3 - 45.1) | n.s. |
| CD 11b [µg/ml] | 32 | 6.6 (3.7 - 9.5) | 0.009 † |
| CD 18 [µg/ml] | 32 | 43.7 (36.5 - 53.6) | < 0.001 † |
| gp91phox [µg/ml] | 35 | 87.5 (79.5 - 114.2) | n.s. |
| p22phox [µg/ml] | 28 | 11.0 (5.8 - 13.1) | n.s. |

| | | | |
|-------------------|----|-----------------------------|---------|
| p47phox [µg/ml] | 35 | 100.6 (74.5 - 148.6) | 0.014 † |
| p67phox [µg/ml] | 35 | 121.4 (85.2 - 159.8) | n.s. |

Tabelle 14: Ergebnisse rt-PCR Untersuchung

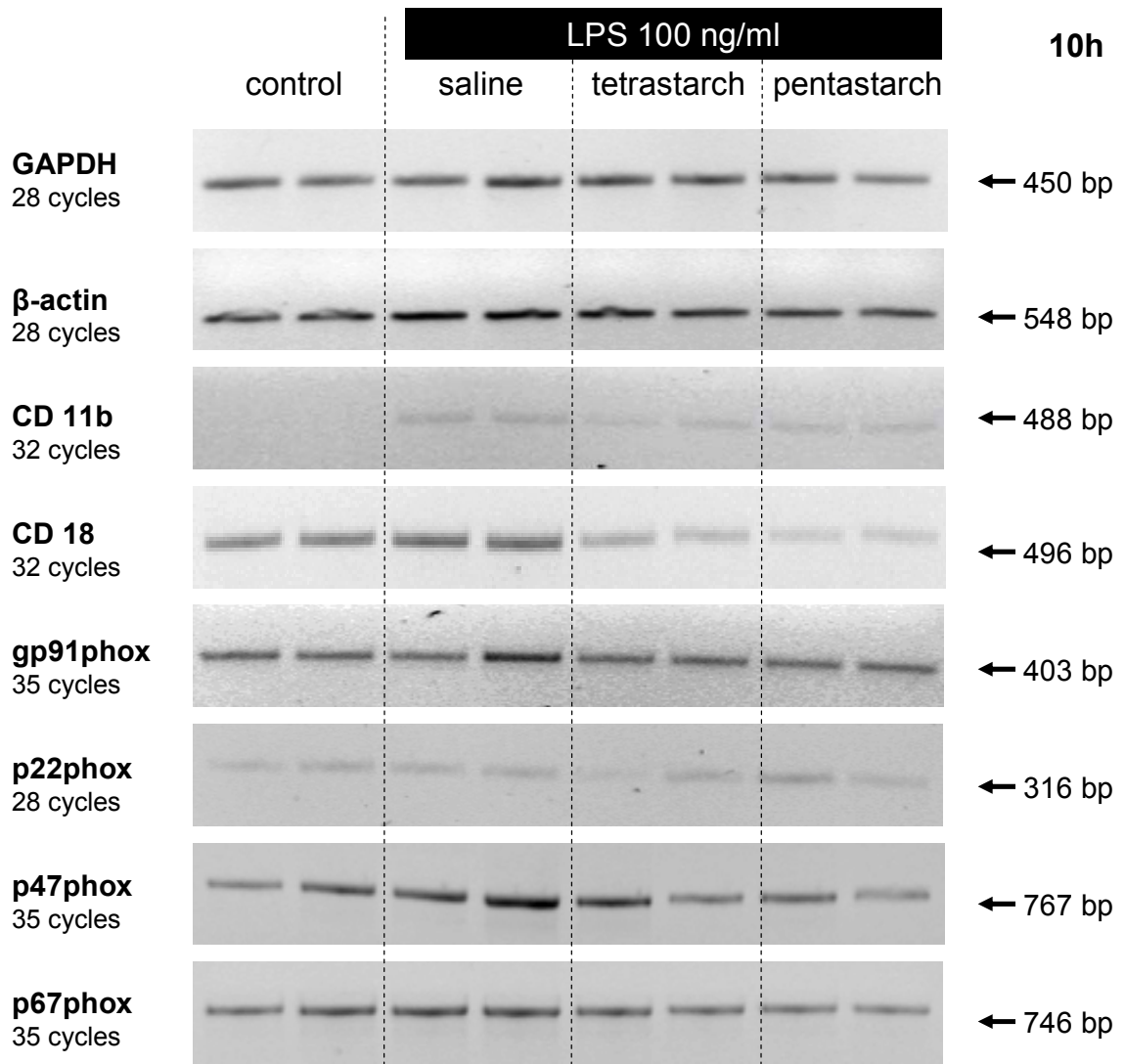


Abbildung 12: Ergebnisse rt-PCR Untersuchung

6 Diskussion

Das Syndrom der generalisierten Inflammation ist seit langem ein relevantes Thema in der Intensivmedizin, da die SIRS, bzw. die Sepsis unverändert mit zu den häufigsten Todesursachen zählen. Seit vielen Jahren gibt es das Bestreben, die zugrundeliegenden Ursachen dieses Problems zu erforschen. Zum besseren Verständnis wurde im Jahr 1991 vom American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) die Terminologie und die Definition der Krankheitsbilder von SIRS (systemic inflammatory response syndrome), Sepsis und schwerer Sepsis international verbindlich definiert [17, 19].

Auf dieser Grundlage baut sich die Therapie der Sepsis mit deren Komplikationen auf. Und auch die Forschung in dem Bereich hat für mehr Klarheit der Erkrankung gesorgt, das Verständnis der einzelnen Stadien ist gewachsen und deren Therapieoptionen wurden immer weiter entwickelt.

Eine wesentliche Erkenntnis für den Verlauf der SIRS und deren Outcome ist eine suffiziente Volumentherapie [90]. Es kommt durch die Vasodilatation und das *capillary leak* zu einem Volumenmangel, der ausgeglichen werden muss, da es andernfalls durch eine Minderperfusion durch den Volumenmangel zu Organschäden kommen kann. Die Frage nach dem geeigneten Infusionsmedium beschäftigt die Wissenschaft seit langem und kontrovers. Es konnte bereits in verschiedenen experimentellen Studien gezeigt werden, dass Hydroxyethylstärke die Adhäsion von Leukozyten am Endothel beeinflusst und auch andere inflammatorische Reaktionen der PMN vermindert [34, 39, 40, 41, 54, 77, 100]. Es wurde bisher jedoch nicht untersucht, ob und wie diese Infusionslösungen auf die PMN und deren Aktivierbarkeit wirken. In dieser Studie wurde an isolierten humanen Leukozyten die inflammatorische Reaktion in Anwesenheit verschiedener Infusionslösungen anhand spezifischer Adhäsionsmoleküle und anhand der Radikalproduktion und MPO-Sekretion untersucht.

In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass Hydroxyethylstärke einen antiinflammatorischen Einfluss auf die *in vitro* stimulierten Leukozyten hat. Es

muss also in weiteren Studien untersucht werden, ob dieser Effekt in der Initialtherapie von Sepsis und SIRS genutzt werden kann.

6.1 Diskussion der Methodik

6.1.1 humane Granulozyten

Die Rolle der Granulozyten in der systemischen Inflammationsreaktion ist bereits gut erforscht und in vielen Publikationen beschrieben. Ihre Funktion in der Erregerabwehr ist gut untersucht und auch die überschießende Reaktion, die in einer SIRS mit einem Multiorganversagen enden kann. Die überschießende Reaktion und die Sekretion von zytotoxischen Substanzen ins Gewebe führen zu Organschädigungen und Ödembildung. Beispielhaft genannt sei die Lunge, wo es verstärkt durch ein physiologisches Leukozytenpooling in der Lunge infolge der Aktivierung zur Adhäsion in den Lungenkapillaren und der Sekretion der toxischen Substanzen in das Lungengewebe zum ARDS kommen kann.

Aufgrund bereits vielfach durchgeführter Untersuchungen gibt es eine gute Datenlage zur Isolation und Stimulation humaner neutrophiler Granulozyten. Wir verwendeten deshalb Vollblut von gesunden, freiwilligen Probanden und isolierten daraus die PMN. Die Isolation mittels einer Dextran-sedimentation und der Hypaque-Ficoll Methode ist in den meisten veröffentlichten Untersuchungen über neutrophile Granulozyten beschrieben und hat sich als Trennmethode der PMN von Lymphozyten und Monozyten bewährt [21]. Um eine größtmögliche Reinheit zu gewinnen, wurde außerdem eine hypotone Lyse der Erythrozyten durchgeführt [51, 57, 107]. Die Lyse der Erythrozyten ist ein wesentlicher Bestandteil der Aufbereitung, da rote Blutzellen in der FACS-Analyse zu einer verlängerten Messzeit führen, so dass in der festgelegten Analysezeit weniger PMN gemessen werden können. Außerdem führen Erythrozyten zu einer Verminderung der Lichtemission und verringern dadurch das Fluoreszenzmaximum [46].

Es wird in diversen Arbeiten in Zusammenhang mit der Zellisolation das Phänomen der Aktivierung der zu isolierenden Zellen, in unserem Fall der neutrophilen Granulozyten beschrieben. Es kommt zu einer Autoaktivität bevor

eine kontrollierte Stimulation stattfindet. Dies ist durch keine in der Literatur beschriebene Methodik zu verhindern. So wurde für diese Arbeit bei jedem Versuchsdurchgang die Negativkontrolle als Referenz bestimmt und somit die Aktivierung durch die Isolation ausgeglichen.

6.1.2 Antikoagulation

Die im klinischen Alltag in der Labormedizin gebräuchlichen Antikoagulantien sind EDTA, Heparin und Citrat. Diese sind auch im experimentellen Bereich in der Zellisolation gut untersucht.

Die Wahl des Antikoagulanz und die Berücksichtigung möglicher Effekte auf die Versuche sind für die Bewertung der Ergebnisse wesentlich. Das funktionelle Verhalten der Granulozyten sowie die Menge und Affinität der exprimierten Oberflächenrezeptoren können sich abhängig von der eingesetzten Substanz verändern [30, 89, 105].

Die Verwendung von EDTA wurde 1988 in einer Arbeit von Nash et al. als Antikoagulanz der Wahl empfohlen [75]. Durch diese Antikoagulation sollen Zellaggregationen verhindert und eine höhere Flow-rate in der FACS-Analyse erreicht werden als bei Heparin und Citrat. In einer anderen Studie konnte allerdings gezeigt werden, dass es bei einer Antikoagulation durch EDTA im Vergleich zu Heparin und Citrat zu einer verminderten Fluoreszenzaktivität des verwendeten DR-Antikörpers gegen einen CD 11b Oberflächenrezeptor kam [89]. Ursächlich hierfür wird die Kalziumabhängigkeit des Bindungsprozesses angenommen, da durch Einsatz eines kalziumunabhängigen Antikoagulanz dieses Problem nicht auftrat. Durch die Substitution von Kalzium kam es jedoch zu einer erhöhten Letalität der Granulozyten [89, 112].

Heparin ist ebenfalls ein häufig eingesetztes Antikoagulanz in der Zellisolation. Im Vergleich zum Citrat kommt es bei Heparin zu einer erhöhten Expression einiger Oberflächenmoleküle. Allerdings sind viele Prozesse wie die Expression von Oberflächenmolekülen und deren Bindung kalziumabhängig, so dass der Einsatz von EDTA oder Citrat-Antikoagulation nicht empfohlen wird, wenn eine kationenabhängige Bindungsfähigkeit der Antikörper besteht oder wenn

kalziumabhängige Zellfunktionen gemessen werden [89, 105]. Heparin ist weit verbreitet und ein geeignetes Präparat zur Antikoagulation von Vollblut [71].

6.1.3 Stimulation

Für die durchgeführten Versuche haben wir für die in vitro durchgeführte Stimulation hochgereinigtes Endotoxin Lipopolysaccharid von *Escherichia coli* Serotyp 0111:B4 (LPS) sowie das Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) verwendet. Beide Substanzen sind in diversen experimentellen Studien zur Leukozytenstimulation verwendet worden und haben sich für die Simulation einer inflammatorischen Reaktion etabliert.

Das LPS induziert eine intrazelluläre Stimulation und eine Signalkaskade, nachdem es an das LPS-Bindungsprotein (LPSLBP) gebunden wurde und dieses mit einem Zelloberflächenmolekül CD14 interagiert. Der LPSLBP-CD14 Komplex löst die intrazelluläre Signalkaskade in den PMN aus, wodurch proinflammatorische Proteine synthetisiert werden, es zur Expression von Adhäsionsmolekülen und zum oxidativen Burst kommt.

PMA passiert ungehindert die Zellmembran und aktiviert direkt die Phosphokinase C (PKC) durch Imitation eines PKC-Aktivators. Dadurch erfolgt eine nachhaltige Aktivierung der PMN, es kommt auch hier zu einer gesteigerten Expression von Oberflächenmolekülen und zu einem oxidativen Burst [29, 67].

Um für jede einzelne Versuchsreihe ein Ergebnis mit einer möglichst hohen Aussagekraft erreichen zu können, wurde jeder Versuchsreihe Vorversuche durchgeführt, in denen das passende Stimulans bestimmt und die optimale Dosierung festgelegt wurde.

Wie auch in der Literatur beschrieben [29], kommt es v. a. durch das LPS zu einer starken Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade und der Expression von Oberflächenmolekülen. Auch in unseren Versuchen war die Stimulation mit ausschließlich LPS gegenüber PMA und der Kombination aus LPS+PMA überlegen in Bezug auf die Expression von CD 11b, CD 66 und Cytochrom b_{558} . Die Dosis des LPS, mit der die PMN am stärksten stimuliert wurden und es nicht

zu einem Zelltod kam, betrug 100µg/ml. Diese Konzentration des LPS ist vergleichbar mit den Dosierungen in anderen Arbeiten [29].

Zur Bestimmung der Aktivierung der Leukozyten anhand der Degranulation und Sekretion der Myeloperoxidase und der Sauerstoffradikalen wurde ebenfalls eine Versuchsreihe zur Findung der optimalen Stimulation durchgeführt. Hierbei zeigte sich das PMA als effektivstes Stimulans. Für die Stimulierung der PMN zur Messung der MPO erwies sich eine Dosierung von 200ng/ml als gut, für die Sekretion von Superoxidanionen reichte dagegen schon eine Dosierung von 20ng/ml PMA. Die Ergebnisse unserer Dosisfindungsversuche für PMA sind mit den eingesetzten Konzentrationen in anderen Studien vergleichbar. Für die Produktion von Reactive oxygen species (ROS) durch in vitro stimulierte Leukozyten wurde diese in einer anderen experimentellen Studie mit 100 ng/ml stimuliert [12]

6.1.4 Infusionsmedien

6.1.4.1 Physiologische Kochsalzlösung

In den durchgeführten Versuchen wurde in den NaCl-Gruppen die isolierten neutrophilen Granulozyten in kristalloider Kochsalzlösung (NaCl- Lösung) inkubiert und stimuliert. Den Versuchsansätzen wurden jeweils 250 µl 0,9% NaCl zugegeben.

NaCl-Lösung ist nach wie vor eine der am meisten genutzten kristalloiden Infusionslösungen weltweit. Die Osmolarität von 0,9% NaCl beträgt 308 mosmol/l und ist damit isoton. In einem Liter NaCl-Lösung befinden sich 154 mmol Natrium und 154 mmol Chlorid. Die Infusionslösung ist frei von onkotisch wirksamen Teilchen, so dass sich die Lösung im intravasalen und extravasalen Raum gleich verteilt. Eine Passage der Flüssigkeit über die Zellmembran der PMN erfolgt nicht, so dass es nicht zu einer Zellschwellung oder Zellschrumpfung der Leukozyten kommt. Die Verwendung größerer Mengen von isotoner Kochsalzlösung führt zu einem unphysiologisch hohen Angebot von Chloridionen und somit zu einer Hyperchloridämie. Die klinische Auswirkung einer Hyperchloridämie ist wissenschaftlich sehr umstritten. Vor allem bei gesunden Patienten konnte keine

pathologische Auswirkung festgestellt werden, so dass NaCl-Lösung weiterhin einen hohen Stellenwert in der Flüssigkeitstherapie besitzt [9, 47, 80]. Bei kritisch kranken Patienten in der Sepsis oder im akuten Nierenversagen wurde jedoch bei großer Infusion von Kochsalzlösung ein schlechteres Outcome beobachtet [27, 45, 79, 114].

6.1.4.2 Hydroxyethylstärke

Zur Untersuchung der Effekte von Hydroxyethylstärke auf die Stimulierbarkeit und die Reaktion der PMN wurde den Versuchsansätzen jeweils 250 µl entweder von isoonkotischem 6% HES 130/0,4 in der HES 130-Gruppe oder von hyperonkotischem 10% HES 200 0,5 in der HES 200-Gruppe zugegeben.

Hydroxyethylstärke gehört zu den synthetisch hergestellten kolloidalen Infusionslösungen. Es ist eine aus Amylopektin hergestellte Volumenersatzlösung, das eine Volumenwirkung von 100% (HES130/0,4), bzw. eine Volumenwirkung von 167% (HES 200/0,5) besitzt. Zur Vorbeugung eines schnellen Abbaus durch die Serumamylase und die anschließende renale Elimination werden die Hydroxylgruppen des Amylopektins mit Hydroxyethylgruppen substituiert. Der Anteil der mit Hydroxyethylgruppen substituierten Glucosemoleküle wird dabei durch den Substitutionsgrad angegeben. Verschiedene HES-Lösungen werden durch den Substitutionsgrad (0,4/0,5) und das mittlere Molekulargewicht charakterisiert (130.000/200.000).

Das weltweit am häufigsten eingesetzte Kolloid ist die Hydroxyethylstärke. In den letzten Jahren wurde jedoch der Einsatz bei schwerstkranken Patienten zunehmend kritischer betrachtet, da bei Einsatz von HES-Lösungen vermehrt Komplikationen wie akutes Nierenversagen mit Nierenersatzverfahren und Gerinnungsstörungen beobachtet wurden. Vor allem bei den höhermolekularen und hyperonkotischen Stärkeverbindungen 10% HES 200 0,5 wurde bei kritisch Kranken ein Anstieg des Risikos auf ein akutes Nierenversagen festgestellt [81,115]. Die Surviving Sepsis Campaign Guidelines empfehlen den Einsatz von Kolloidallösungen einzuschränken und bei Patienten in der Sepsis die Anwendung zu vermeiden [33]. In der CRISTAL Studie von Annane et al. konnte bei ICU Patienten kein Unterschied in der 28-Tage Mortalität zwischen den Patienten, die

Kolloidlösungen erhalten und denen, die nur kristalloide Lösungen erhalten haben, festgestellt werden [6]. Auch die 90-Tage Mortalität war in der Gruppe, die kolloidale Lösungen erhalten hat, nicht größer als in der Kristalloidgruppe. [6,73]. Die Leitlinien zur Infusionstherapie bei Erwachsenen empfehlen im perioperativen Bereich und bei nichtseptischen Patienten den Einsatz von HES und Kristalloiden gleichwertig als Volumentherapie [10]. Es gibt bisher keine klinischen Studien zur HES-Wirkung in der Sepsis für die Therapie in der Initialphase der Sepsis. Die vorhandenen Daten stammen aus tierexperimentellen und experimentellen Studien.

6.1.4.3 Gelatine

Gelatine ist ebenfalls eine als Plasmaexpander genutzte Infusionslösung, die bei Volumenmangel u. a. in der intensivmedizinischen Therapie und dem perioperativen Management eingesetzt wird. Es ist eines der ersten synthetisch hergestellten kolloidalen Infusionslösungen, das als Abbauprodukt durch Hydrolyse aus Kollagen entsteht [93]. Succinylierte oder modifizierte, flüssige Gelatine besitzt ein Molekulargewicht von 30.000 Dalton, und ist charakterisiert durch langgezogene Polypeptidketten und eine signifikant negative Ladung durch die Succinylation. Der Einsatz von Gelatine intravenös im Schock wurde bereits im Jahr 1915 von Hogan et al. beschrieben [55].

Lange Zeit galt der Einsatz der Gelatine als problemlos, da keine dosisabhängigen Komplikationen bei der Gabe beobachtet wurden, besonders nicht in der intraoperativen Hämostase. Auch in Bezug auf die Nieren galt Gelatine als weniger schädlich als andere Kolloide. Es konnte allerdings in den letzten Jahren in retrospektiven Studien gezeigt werden, dass es bei Patienten, die sich in einer schweren Sepsis befanden bzw. sich kardiochirurgischen Eingriffen unterziehen mussten, und dabei u. a. Gelatine zur Volumentherapie mit erhielten, zu einem vermehrten Auftreten von Nierenversagen und einem erhöhten Transfusionsbedarf kam [14,15].

In einem systematischen Review und einer Metaanalyse von Thomas-Rueddel et al. wurden unterschiedliche kolloidale Infusionslösungen verglichen. Es konnte lediglich für die Gelatine gezeigt werden, dass bei hochdosierter Gabe ein

erhöhtes Risiko für eine benötigte allogenen Bluttransfusionen besteht. Bezüglich des Auftretens von akutem Nierenversagen mit Nierenersatztherapie bei schwerkranken Patienten wurde ein erhöhtes Risiko in der Gruppe festgestellt, die Gelatine erhielt. Allerdings bestand kein Unterschied zu den Patientengruppen, die mit HES therapiert und behandelt wurden [102].

Wir untersuchten also Gelatine ebenso als Plasmaexpander und häufig eingesetztes Infusionsmedium in unseren Versuchsreihen. Die Dosierung war identisch wie im Versuchsaufbau von NaCl und HES, d. h. jedem Versuchsansatz wurde 250 µl Gelatine in einen Milliliter Versuchsansatz zugefügt.

6.1.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie hat in der medizinischen Diagnostik und in der Forschung eine Schlüsselrolle eingenommen. Die FACS Analyse ist ein etabliertes Verfahren, das aufgrund eines großen Spektrums an spezifischen Antikörpern einen weiten Einsatzbereich ermöglicht und ein schnelles und ein spezifisches Untersuchungsverfahren ist. Eine wichtige Rolle kommt diesem Verfahren in der klinischen Diagnostik von angeborenen Immunerkrankungen zu [38]. In der Forschung hat die FACS Analyse ebenfalls eine wichtige Rolle. Das Verständnis von der inadäquaten Neutrophilenaktivierung mit der Folge der Gewebeschädigung bis hin zur SIRS, zum ARDS und zur Sepsis konnte wesentlich durch die Untersuchungen der Durchflusszytometrie entwickelt werden [105].

Die Leukozyten spielen eine entscheidende Rolle in der Infektabwehr. Die dazu zur Verfügung stehenden Mechanismen der PMN sind inzwischen gut untersucht. Nach der Aktivierung bilden sie verstärkt Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche aus, sie exprimieren die membranständige NADPH Oxydase und sie sezernieren zytotoxische Substanzen. Die Veränderungen der PMN während der Inflammationsreaktion können mittels FACS quantifiziert werden, indem die Anzahl der Oberflächenmoleküle gemessen werden.

Da wir die Ausprägung der inflammatorischen Reaktion von Leukozyten in vitro untersuchen wollten, war die Durchflusszytometrie für uns das am besten

geeignete Verfahren zur Bestimmung der Quantität der Expression der Oberflächenmoleküle vor und nach Stimulation. Nach Stimulation der PMN, wie beschrieben, wurden die Zellen mit Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle und dann mit einem fluoreszierenden zweiten Antikörper gegen die ersten Antikörper markiert und gemessen.

Um mögliche Fehlerquellen auszuschließen, wurden in jeder Versuchsreihe als Referenz nicht stimulierte Zellen, die unter gleichen Bedingungen isoliert wurden, mit gemessen, um eine Autoreaktion während der Inkubation oder auch durch die Markierung mit den Antikörpern auszuschließen und um einen Referenzwert zu bestimmen. Es wurde auch eine Autofluoreszenz der Leukozyten ausgeschlossen, indem die Zellen ohne den ersten Antikörper gemessen wurden.

6.1.6 Oberflächenmoleküle

6.1.6.1 CD 11b/CD 18

Das Molekül CD 11b/CD 18 besteht aus drei membranständigen heterodimeren Glykoproteinen und gehört in die Familie der β -Integrine. Es hat seine Funktion als Adhäsionsmolekül auf der Zelloberfläche der Leukozyten und ermöglicht eine frühe Leukozyten-Endothel-Adhäsion zum Ort der Inflammation. Es konnte bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass im Rahmen einer Entzündungsreaktion die Leukozyten vermehrt CD 11b auf der Zelloberfläche exprimieren und dass dieses Molekül somit als Biomarker verwendbar ist. In einer Studie von Davies HM et al. konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der PMN über die CD 11b-Expression nachgewiesen werden konnte [32]. In ihrer Studie wurden die Leukozyten u. a. mit LPS stimuliert und es konnte eine schnelle und ausgeprägte Steigerung der CD 11b-Expression nachgewiesen werden.

Auf dieser Grundlage haben auch wir in unserer Studie die Expression von CD 11b als Grad der Stimulation der Leukozyten in vitro benutzt und diese mittels FACS Analyse bestimmt.

6.1.6.2 CD 66b

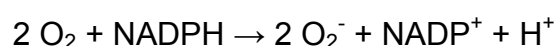
CD 66b gehört ebenfalls wie CD 11b zu der Familie der β -Integrine. Es ist ein Bestandteil der Gruppe der carcinoembryonischen Antigene (CEA), welche in die große Gruppe der Immunglobuline gehören, und hat einen weiteren Einfluss auf die Leukozytenbindung an das Endothel nach Aktivierung zur Paravasation [74].

In einer Studie von Furebring et al. wurde ex vivo Leukozyten mittels LPS stimuliert und die Expression der Oberflächenmoleküle, u. a. CD 66b untersucht [44]. Es konnte gezeigt werden, dass das Adhäsionsmolekül nach LPS Stimulation signifikant erhöht auf der Zelloberfläche nachzuweisen war. Somit ist CD 66b für unsere Versuchsreihe wie auch CD 11b gut geeignet, um die Stimulation der Leukozyten durch LPS zu detektieren.

6.1.6.3 Cytochrome b_{558}

Das Cytochrome b_{558} ist ein Teil der NADPH-Oxidase der neutrophilen Granulozyten. Die NADPH-Oxidase ist ein Enzym-Komplex, mittels dessen die Granulozyten Sauerstoffradikale zur Erregerabwehr produzieren. Die Oxidase besteht aus fünf Proteinen: $p40PHOX$ ($PHOX$ steht für PHagocyte OXidase), $p47PHOX$, $p67PHOX$, $p22PHOX$ und $gp91PHOX$. In der ruhenden Zelle bilden die Teile $p40PHOX$, $p47PHOX$ und $p67PHOX$ einen inaktiven Komplex. Die Komponenten $p22PHOX$ und $gp91PHOX$ befinden sich in der Membran eines zytosolischen Vesikels. Dieser membranständige Komplex bestehend aus $p22PHOX$ und $gp91PHOX$ wird als Cytochrom b_{558} bezeichnet.

Bei Aktivierung des PMN verbinden sich die einzelnen Komponenten zu einem Enzym-Komplex, der NADPH-Oxidase. Diese produziert aus $O_2 + NADPH$ Sauerstoffradikale.



Das Cytochrom b_{558} ist ein membranständiges heterodimeres Flavohemoprotein, dessen Funktion im Enzym-Komplex aus dem Transfer der Radikale aus der Zelle besteht. Dieses Heterodimer besteht aus der α -Untereinheit $p22PHOX$, der β -Untereinheit $gp91PHOX$ und dem Flavin Adenosin Dinukleotid (FAD), welches als

NADPH-Bindungsstelle dient. Ebenfalls zum Cytochrom b_{558} gehören zwei Häm-Gruppen.

Eine der Hauptaufgaben der Leukozyten besteht in der Erregerabwehr mittels Radikalbildung. Durch Aktivierung kommt es zum Einbau der sich in der Membran der zytosolischen Vesikel befindlichen Cytochrom b_{558} und dieses verbindet sich mit den anderen drei Komponenten zur NADPH-Oxidase. Somit ist die Anzahl der an der Zelloberfläche exprimierten NADPH-Oxidasen ebenfalls ein guter Marker für die Aktivierung der Granulozyten. Wir haben in unseren Versuchen die Expression der NADPH-Oxidase auf aktivierten Granulozyten mittels FACS-Analyse bestimmt und dadurch Rückschlüsse ziehen können auf den Grad der inflammatorischen Reaktion [11,95].

6.1.7 Myeloperoxidase

Die Sekretion der Myeloperoxidase ist ein weiterer Mechanismus der unmittelbaren Erregerabwehr der neutrophilen Granulozyten. In azurophilen Granula gespeichert befindet sich das Enzym intrazellulär und wird nach Aktivierung der Zelle freigesetzt. Die Messung der Sekretion der MPO von stimulierten Leukozyten *in vitro* und *in vitro* ist ein häufig verwendetes Versuchsmodell zum Nachweis des Aktivierungsgrades der Zellen [39, 40, 41, 103, 104, 109].

Im Rahmen unserer Studie wurde die Freisetzung der MPO als weiterer Marker der Aktivierung benutzt. Der Nachweis von sezerniertem MPO aus isolierten PMN mittels Oxidation von Tetramethylbenzidin ist ein Verfahren, das in vielen Studien verwendet wird. Somit konnten wir auch hier mit einem etablierten Modell die Aktivierbarkeit der Leukozyten in Bezug auf die MPO-Sekretion in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Infusionslösungen untersuchen [4].

6.1.8 SOD-Assay

Die Erregerabwehr erfolgt u. a. mittels Produktion und Freisetzung von Radikalen und Lysozymen durch die neutrophilen Granulozyten. Dabei spielt die Produktion von Sauerstoffradikalen eine wichtige Rolle. Die O_2^- - Radikale werden mittels der

membranständigen NADPH-Oxidase produziert. Dieses Enzym wird nach Aktivierung der Zelle in die Membran eingebaut und katalysiert dort die Reaktion zwischen O_2 und dem NADPH, wodurch Sauerstoffradikale entstehen. Neben der eigentlichen Funktion der Schädigung von Erregern führt die Radikalbildung in der generalisierten inflammatorischen Reaktion durch ungerichtete Freisetzung auch zu Endothelschäden, wodurch eine Kapillardurchlässigkeit hervorgerufen werden kann [116].

Die Expression der NADPH-Oxidase auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten und auf molekularer Ebene haben wir in unserer Studie mit untersucht. Mit dem SOD-Assay untersuchten wir die Menge der produzierten Superoxidanionen durch die stimulierten PMN. Die Radikalproduktion der PMN gehört mit zu der initialen Reaktion auf einen Stimulus in der Inflammationskaskade. Somit haben wir die Superoxidanionenproduktion ebenfalls als Marker der Aktivierung der Leukozyten gemessen.

Der SOD-Assay ist ein etabliertes Verfahren, das in experimentellen Studien zur Analyse der Superoxidanionen genutzt wird. Dabei wird in einer Reaktion das Cytochrom C reduziert, wodurch dieses seine Farbe wechselt und photometrisch nachgewiesen werden kann. Da das Cytochrom C allerdings auch von anderen Radikalen reduziert werden kann, erfolgt ein Vergleichsansatz mit der Superoxiddismutase, die Sauerstoffradikale in H_2O_2 und O_2 umwandelt. Die Differenz der beiden Versuchsansätze ergibt die durch O_2^- reduzierte Cytochrommenge und somit die Menge der freigesetzten Sauerstoffradikale. Um eine mögliche Re-oxidationsreaktion des reduzierten Cytochrom C mit Wasserstoffperoxid zu verhindern, wurde den Versuchen Katalase zugefügt [35,53,85].

Wir untersuchten in unserer *in vitro* Studie den Einfluss der Infusionslösungen auf die Radikalproduktion, um daraus Rückschlüsse auf eine mögliche reduzierte Aktivierung der Leukozyten zu ziehen, wodurch letztendlich es zu einem geringeren Gewebeschaden kommen kann.

6.1.9 rt-PCR Untersuchung

In den vorhergehenden Untersuchungen wurde die Aktivierbarkeit der Leukozyten anhand der Produktion inflammatorischer Substanzen wie Adhäsionsmoleküle an der Zelloberfläche und die Produktion und Sekretion von Sauerstoffradikalen gemessen. Um auch die intrazelluläre Aktivität und den Einfluss der Infusionslösungen auf die Gen-Expression zu bestimmen, wurde nach Stimulation der PMN die Expression auf Transkriptionsebene für die Moleküle untersucht, die wir bisher als Stimulationsmarker benutzt haben.

Die rt-PCR ist ein etabliertes Verfahren zur Detektion der Gen-Expression. Wir führten die Versuche nach einem standardisierten Verfahren mittels eines Kits durch, so dass wir eine hohe Qualität bei der Isolierung der RNA gewährleisten konnten. Für die Durchführung der Versuche haben wir in diversen Vorversuchen herausgearbeitet, dass eine Stimulation in Vollblut über 10h die aussagekräftigsten Ergebnisse brachten. Die Verwendung von Vollblut für die Dauer der Stimulation muss jedoch bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Wir untersuchten mittels rt-PCR die Expression der Oberflächenmoleküle CD 11b und CD 18, sowie die Untergruppen der NADPH-Oxidase Cytochrom b_{558} gp91phox, p22phox, p47phox und p67phox. Als Kontrollgen wurde die GAPDH (Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase) und das β -actin verwendet. Die GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse, das in jeder tierischen Zelle vorkommt und deshalb in allen Gruppen gleichermaßen exprimiert wird.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Studie wurde *in vitro* der Effekt von Infusionslösungen auf die Aktivierbarkeit von Leukozyten untersucht. In Krankheitsbildern wie der SIRS, bzw. der Sepsis kommt es in der Frühphase zu einer generalisierten Aktivierung von Leukozyten sowie ebenfalls früh zur Ausbildung eines *capillary leak*. Diese pathophysiologischen Mechanismen münden in einem relativen Volumenmangel. Um diesen auszugleichen, stehen neben kristalloiden Infusionslösungen wie NaCl auch kolloidale Substanzen wie Hydroxyethylstärke oder Gelatine zur Verfügung.

Durch die erhöhte vaskuläre Permeabilität aufgrund von Gefäßschädigungen und Störungen der endothelialen Barriere kommt es zu einem verstärkten Übertritt von intravasaler Flüssigkeit ins Interstitium mit der Gefahr einer Ödembildung, was z. B. in der Lunge zum Lungenödem mit Gefahr des ARDS führen kann. Der Ausgleich des Volumenmangels unter Berücksichtigung der Komplikationen wird somit in der Intensivmedizin zu einer großen Herausforderung. Drei wesentliche Gründe sind bekannt, die zu dem Volumenmangel führen: die Vasodilatation, venöses Pooling und die gestörte Endothelgrenze, die durch die Mediatoren aktivierter Leukozyten verursacht wird. Da das Gewebe und die Organe weiterhin suffizient mit Sauerstoff versorgt werden müssen, ist ein effektives Volumenmanagement eine wichtige Maßnahme in der frühen Therapie des septischen Schocks. Eine Meta-Analyse, in die vier prospektive, randomisierte Studien eingeschlossen wurden, zeigte, dass ein am cardiac output gesteuertes Flüssigkeitsregime zu einem verkürzten Krankenhausaufenthalt und zu einer Abnahme der Komplikationsrate führt. Außerdem kommt es durch eine zielgerichtete Volumentherapie zu einer Reduktion von Morbidität und Mortalität sowie zu einer Verringerung der pulmonalen Komplikationen [59].

Die Frage, ob kristalloide oder kolloidale Infusionslösungen geeigneter sind, beschäftigt seit Jahren viele Forschungsgruppen und führt zu einem seit Jahren anhaltendem Disput. Wie oben bereits beschrieben, können große Mengen kristalloider Flüssigkeiten aufgrund von einer Verschiebung des intravasalen onkotischen Druckes durch Proteinverlust zu einer Verstärkung von Ödembildung

führen, während die synthetischen Kolloide aufgrund des Nebenwirkungsprofils mit Gerinnungsstörungen und Nierenschädigung umstritten sind.

Neben den nachgewiesenen Komplikationen, die v. a. in Studien beobachtet wurden, in denen das HES 200/0,5 eingesetzt wurde, konnte durch Verwendung von kolloidalen Infusionslösungen eine verringerte Endothel-Leukozytenbindung [58] und eine verminderte Infiltration von PMN in der Lunge nachgewiesen werden. Außerdem kam es zu einer Abnahme von oxidativem Stress.

Der Mechanismus hinter diesen Beobachtungen ist nach wie vor ungeklärt. In dieser Studie sollte ein Vergleich verschiedener Infusionslösungen auf die Aktivierung von Leukozyten durchgeführt werden, wobei das Augenmerk sowohl auf Oberflächenmoleküle als auch auf die Produktion oxidativer Substanzen gelegt wurde.

6.2.1 Adhäsionsmoleküle

Bei einer generalisierten Inflammationsreaktion, z. B. während einer Endotoxinämie, kommt es zur systemischen Aktivierung des Leukozytenpools [94]. In den Mikrogefäßen des großen Kreislaufs sind, als typische Charakteristika, Rezeptor-vermittelte Prozesse der Leukozytensequestrierung in der akuten Entzündungsreaktion nachgewiesen [64, 99]. Eine Interaktion von stimulierten Leukozyten mit dem ebenfalls aktivierten Endothel ist über exprimierte Adhäsionsmoleküle auf den Zelloberflächen der PMN und des Endothels vermittelt. Diese Zell-/Zell-Interaktion verläuft nach dem bekannten Modell von SPRINGER [25, 98, 99] in drei Phasen:

Im ersten Schritt der Adhäsionskaskade kommt es zu einem noch reversiblen Rollphänomen der Leukozyten entlang des Endothels [56]. Die in dieser Phase instabile Adhäsion erfolgt in erster Linie durch Adhäsionsmoleküle der Selektinfamilie.

Im darauf folgenden Schritt adherieren die Leukozyten fest am Endothel. Diese Bindung erfolgt durch die Moleküle der leukozytären β 2-Integrine CD 11a,b/CD 18

und CD 66 [61, 92, 98, 99] an die endothelialen Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3.

Diese irreversible Adhäsion ist Voraussetzung für den letzten Schritt, die transendotheliale Diapedese der Leukozyten in das Gewebe.

Die β 2-Integrine haben folglich einen entscheidenden Einfluss auf die Leukozytenadhäsion am Endothel in der aktivierten Phase. Um den Grad der Aktivierung zu bestimmen, wurde in unserer Studie die Expression der Adhäsionsmoleküle CD 11b und CD 66b gemessen. Dies erfolgte zum einen durch die FACS-Analyse, indem nach *in vitro* Stimulation die Molekülexpression auf der Zelloberfläche der neutrophilen Granulozyten bestimmt wurde. Zum anderen wurde auf molekularer Ebene die Produktion von mRNA mittels rt-PCR gemessen.

Zu jeder Versuchsreihe wurden Vorversuche durchgeführt, um evtl. Fehlerquellen wie eine Autofluoreszenz und eine Aktivierung durch den Isolationsvorgang auszuschließen.

Es wurde nach jedem Isolationsvorgang die Vitalität der Leukozyten mittels der Trypan-Blau Färbung überprüft. Die Zellen wurden in der Neubauer-Kammer ausgezählt, um gleiche Zellkonzentrationen in den Versuchsansätzen zu gewährleisten.

Eine Autofluoreszenz der Leukozyten konnten wir ausschließen. Wir sahen in unseren Kontrollversuchen keine relevante Stimulation der PMN durch den Isolationsvorgang. Die Isolierung der Granulozyten erfolgte über eine etablierte Methode analog zur Literatur. Auch in den Ergebnissen der anderen Arbeitsgruppen wurde keine relevante Aktivierung durch die Isolation detektiert [21, 76].

Es wurde zu jeder Versuchsreihe eine Negativkontrolle ohne Zugabe eines Stimulans durchgeführt, diese mit den Antikörpern der zu untersuchenden Struktur markiert. Dieser Ansatz galt als Referenz. Ebenso wurde ein Ansatz zur Positivkontrolle ohne Zugabe eines der zu untersuchenden Infusionsmedien

durchgeführt. Wir sahen eine gute Aktivierbarkeit der PMN und brachten damit den Nachweis, dass die Zellen vital waren und das System funktionierte.

Nach zweistündiger Inkubation und Stimulation konnten wir für das Adhäsionsmolekül CD 11b eine signifikant höhere Expression in der NaCl, HES 200 und Gelatine Gruppe nachweisen im Vergleich zu der negativen Kontrollgruppe. In der HES 130 Gruppe kam es dagegen zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Daraus lässt sich schließen, dass die Leukozyten, die mit der HES 130/0.4 Lösung inkubiert wurden, weniger stark aktiviert wurden als die Leukozyten in den anderen Gruppen. In der Gelatine Gruppe wurde bereits ohne Stimulation eine signifikant erhöhte Expression beobachtet.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in der Messung des Adhäsionsmolekül CD66b. Auch hier kam es in der NaCl und in der Gelatine Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der Moleküle an der Zelloberfläche im Vergleich zur negativen Kontrollgruppe, wohingegen in der HES 130 und in der HES 200 Gruppe kein signifikanter Anstieg beobachtet werden konnte.

Bezüglich der mRNA-Expression konnten wir zeigen, dass es durch die Stimulation der Leukozyten in Anwesenheit von Kochsalzlösung zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression für CD 11b, CD 18 kam. In dem Versuchsansatz mit HES 130 zeigte sich nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten für das Adhäsionsmolekül CD 18 ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression, die Genexpression für das CD 11b war gegenüber der Negativkontrolle nicht erhöht.

Unsere Ergebnisse passen zu Beobachtungen, die in anderen Arbeiten beschrieben wurden. Feng et al. hat 2007 [41] an einem Rattenmodell untersucht, ob modifizierte Gelatine oder 6% HES 130/0.4 einen Einfluss auf das pulmonale *capillary leak* oder auf die inflammatorische Reaktion anhand von inflammatorischen Cytokinen/Chemokinen hat.

Dazu wurde bei Ratten eine generalisierte inflammatorische Reaktion mittels Cöcalligatur und -punktion verursacht. Gemessen wurde Tumornekrose-Faktor- α , Interleukin-1 β und Macrophagen inflammatory protein-2 mit der ELISA Methode.

Das pulmonale *capillary leak* wurde durch die Evans blue dye Extravasationsmethode bestimmt. Die Myeloperoxidaseaktivität wurde photometrisch und die mRNA-Expression des ICAM 1 per rt-PCR gemessen.

Die Ergebnisse dieser tierexperimentellen Studie zeigten, dass HES die Ausprägung des pulmonalen *capillary leak* durch die Beeinflussung der inflammatorischen Antwort abschwächt.

Dieses Ergebnis wurde durch eine weitere tierexperimentelle Studie bestätigt. Tian et al. haben in einem Rattenmodell die Lungenkapillarpermeabilität, die Akkumulation von PMN in der Lunge und die Expression von CD 11b auf den PMN gemessen.

Sie konnten zeigen, dass die CD 11b-Expression in Anwesenheit von HES auf den PMN vermindert ist, die Kapillarpermeabilität verringert wird und die Akkumulation von Granulozyten in der Lungenstrombahn reduziert ist. Allerdings verwendetet die Arbeitsgruppe in diesen Tierexperimenten das höhermolekulare HES 200/0.5 [103].

In einer Studie von Handrigan et al. sollte der Effekt von HES direkt auf Leukozyten und auf Endothelzellen untersucht werden. Es wurden humane neutrophile Granulozyten verwendet, die nach der gleichen Methode aus Vollblut isoliert wurden wie die Zellen in unserer Studie. Außerdem wurden humane Endothelzellen von Umbilicalvenen stimuliert. Es wurde die Expression von CD 11b und L-Selektin auf der Zelloberfläche durch FACS-Analyse gemessen. Die Expression anderer Adhäsionsmoleküle wurde mittels ELISA bestimmt. Stimuliert wurden die Leukozyten mit formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (f-MLP), die Stimulation der Zellen erfolgte in Anwesenheit von 6% HES 130/0.4.

Diese Arbeitsgruppe konnte keinen für HES spezifischen Effekt auf die neutrophilen Granulozyten nachweisen. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen vermindert ist. Dadurch kommt es zu einer reduzierten Endothel-Leukozyt-Interaktion [52].

Unsere Ergebnisse passen in den Kontext der vorliegenden Studien. Es konnte in tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass es durch Zugabe von HES

130/0.4 zu einem verminderten Level an pro-inflammatorischen Cytokinen, sowie zu einer verminderten Expression von P-Selektin und L-Selektin auf Endothelzelloberflächen kommt [41]. Auch die Abnahme der CD 11b Expression auf der Leukozytenoberfläche ist im Tierexperiment beschrieben worden [103] und eine verminderte Leukozyten-Endothel-Interaktion konnte gezeigt werden, in erster Linie durch Abnahme der Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen [52].

In dieser *in vitro* Studie konnte allerdings zum ersten Mal gezeigt werden, dass explizit die Expression von den Adhäsionsmolekülen CD 11b und CD 66 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten in Anwesenheit von HES 130 nach Stimulation nicht erhöht war. Auch auf molekularer Ebene konnte durch die rt-PCR gezeigt werden, dass nach Stimulation mit LPS in Anwesenheit von HES 130 die Genexpression nicht höher war als bei den nicht-stimulierten Leukozyten. In Anwesenheit von HES 200 kam es nach Stimulation lediglich bei der CD 66-Messung zu keiner signifikant erhöhten Expression. In den anderen Gruppen war nach Stimulation die Expression von CD 11b und die Menge an mRNA signifikant erhöht. Die in Anwesenheit von NaCl und Gelatine stimulierten PMN zeigten durchweg eine signifikant erhöhte Expression. Die Ergebnisse der Gelatine Gruppe legen vielmehr nahe, dass allein dieses Infusionsmedium eine aktivierende Wirkung auf Leukozyten hat.

Wir konnten also zeigen, dass es bei *in vitro* stimulierten neutrophilen Granulozyten in Anwesenheit von HES 130/0.4 zu keiner signifikant erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche und auf molekularer Ebene kommt, im Gegensatz zu den stimulierten Zellen in Anwesenheit von NaCl, HES 200 und Gelatine.

6.2.2 Radikalbildung

Um eine weitere Dimension der Leukozytenaktivierung abzubilden und den Einfluss der Infusionslösungen darauf, haben wir in dieser Studie die Produktion der Sauerstoffradikale durch die stimulierten Granulozyten untersucht. Dazu wurde zum einen die Expression vom sauerstoffradikal-bildenden Enzym, die NADPH-Oxidase, und zum anderen die Menge der produzierten

Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) gemessen. Die Expression des sauerstoffradikalbildenden membranständigen Enzym Flavocytochrom b_{558} wurde mittels FACS-Analyse untersucht, die produzierten Sauerstoffradikale wurden mit dem SOD-Assay gemessen.

Die NADPH-Oxidase ist ein Enzym-Komplex, der in zwei inaktiven Teilen in der ruhenden Zelle vorliegt. Eines der Teile wird in Vesikeln gespeichert. Bei Aktivierung der Leukozyten bilden der intravesikuläre Teil, bestehend aus $p22PHOX$ und $gp91PHOX$, und der im Zytosol befindliche Teil, bestehend aus $p40PHOX$, $p47PHOX$ und $p67PHOX$, das membranständige Enzym, die NADPH-Oxidase [95]. Dieses Enzym produziert in einer Reaktion aus Sauerstoff und NADPH Sauerstoffradikale. Als Nebenprodukt entstehen $NADP^+$ und Protonen. Dieses Enzym ist somit im Rahmen der Radikalproduktion an der Erregerabwehr beteiligt, aber auch im inflammatorischen Geschehen an der ungerichteten, körpereigenen Gewebeschädigung. Eine reduzierte Expression würde in der Frühphase der systemischen Inflammation möglicherweise zu einer verminderten Gewebeschädigung mit den Folgeschäden führen. Wir untersuchten in dieser Studie den Effekt der Infusionslösungen auf eine mögliche Veränderung der Expression des Cytochrom b_{558} auf der Zelloberfläche *in vitro*.

Die Ergebnisse unserer Versuche zeigen, dass auch in diesem Versuchsansatz vitale Zellen verwendet wurden und eine gute Stimulation erfolgte. Die Untersuchungen in der FACS-Analyse ergaben, dass das transmembrane Molekül Flavocytochrom b_{558} nach zweistündiger Stimulation der PMN, die in Anwesenheit von NaCl, HES 200 und Gelatine stimuliert wurden, signifikant häufiger exprimiert wurde, als in der unstimulierten Negativkontrolle. Bei den Leukozyten, die in Anwesenheit von HES 130 stimuliert wurden, konnten kein signifikanter Anstieg der Enzymexpression im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen werden. Die Leukozyten in der HES 200 und der Gelatine Gruppe zeigten sogar eine signifikant höhere Expression vom Flavocytochrom b_{558} im Vergleich zur HES 130 Gruppe auf.

Die Ergebnisse unserer PCR-Analyse passen zu denen der FACS-Analyse. Auf molekularer Ebene sehen wir eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von drei der vier untersuchten Untereinheiten der NADPH Oxidase in der NaCl-Gruppe

unter Stimulation, nämlich das gp91phox, das p47phox und das p67phox. In der HES 130 Gruppen ist nur eine Untereinheit, das gp91phox, signifikant zur Negativkontrolle erhöht. Unter Stimulation in Anwesenheit von HES 200 war lediglich die Untereinheit p47phox signifikant erhöht im Vergleich zur Negativkontrolle. In den Versuchsansätzen in Anwesenheit von Hydroxyethylstärke kommt es folglich zu einer signifikant niedrigeren Expression auf molekularer Ebene für die NADPH-Oxidase.

Unsere Daten passen zu den Ergebnissen anderer Arbeiten. In der Arbeitsgruppe von Feng et al. wurde an Ratten die Expression von mRNA von dem Oberflächenmolekül intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) unter Stimulation in Anwesenheit von HES 130 untersucht [103]. In ihrer Studie wurden in drei Gruppen jeweils 20 Ratten durch Coecalligation und -punktion in eine Sepsis gebracht. In den Versuchsgruppen wurden den Tieren entweder NaCl, HES 130 oder Gelatine 4% vier Stunden nach Coecalpunktion verabreicht. Es wurden mehrere inflammatorische Marker untersucht auf Ebene der mRNA Expression im Lungengewebe. Die Ergebnisse zeigen, dass nach Infusion von HES 130 die Endothelzellen der Ratten signifikant weniger mRNA für inflammatorische Marker exprimieren als in der Positivkontrolle. In dieser Studie wurde außerdem eine verminderte Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuklear Faktor NF- κ B nach Zugabe von HES festgestellt. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der die Genexpression reguliert. In der Sepsis wird NF- κ B zu einem wichtigen Werkzeug, da dieser Faktor nach Aktivierung an Promoterregionen bindet und die Transkriptionsrate von inflammatorischen Genen erhöht [65,66]. Eine Hypothese ist, dass Hydroxyethylstärke direkt Einfluss auf NF- κ B nimmt und darüber die Genexpression der Adhäsionsmoleküle und der NADPH-Oxidase reduziert [104].

Wir konnten in unserer Studie zeigen, dass in Anwesenheit von HES 130/0.4 die Leukozyten nach Stimulation signifikant weniger Flavocytochrom b_{558} auf der Oberfläche exprimieren und die Zellen auf molekularer Ebene signifikant weniger mRNA für die Untereinheiten des Cytochrom b_{558} transkribieren. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wurde nicht gemessen, so dass wir letztendlich keine konkrete Aussage über den Mechanismus der reduzierten NADPH-Oxidase Expression machen können.

Um die Menge der Sauerstoffradikale, die durch die NADPH-Oxidase produziert und im Rahmen des oxidativen Bursts freigesetzt werden, zu bestimmen, haben wir den SOD-Assay durchgeführt. Dazu haben wir ein etabliertes Modell benutzt, das von Pick et al. 1981 beschrieben wurde. Die Menge der Superoxidanionen wurde photometrisch gemessen durch die SOD-inhibierte Reduktion des Cytochrom C [35,85].

In Vorversuchen wurde die Aktivierbarkeit der PMN durch die Messung der O_2^- -Sekretion nach Stimulation festgestellt und das optimale Stimulans festgelegt. In den Vorversuchen wiesen die isolierten Leukozyten eine optimale Zunahme der Radikalfreisetzung unter Stimulation von PMA 20 ng/ml auf. Die Ergebnisse der *in vitro* stimulierten Leukozyten in Anwesenheit der zu untersuchenden Infusionslösungen zeigte eine einheitliche signifikante Erhöhung der Radikal-Sekretion in allen Gruppen im Vergleich zur Negativkontrolle.

In einer Arbeit von Welters et al. wurde der Einfluss von Gelatine, HES, Albumin und Dextran auf die Stimulierbarkeit von Leukozyten *in vitro* untersucht [110]. Die Aktivierung wurde u. a. anhand der Expression von CD 11b sowie anhand des oxidativen Bursts gemessen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch den Einfluss von Gelatine es zu einem signifikant erhöhten oxidativen Burst kommt. Dieses Ergebnis deckt sich mit unseren Beobachtungen, dass Gelatine zu einer erhöhten Freisetzung von Radikalen, bei uns das Superoxidanion kommt. Folglich konnte kein Effekt von den Infusionslösungen auf die Gesamtproduktion der Sauerstoffradikale festgestellt werden. Der Mechanismus hinter diesem Effekt ist nachwievor ungeklärt.

6.2.3 Degranulation

Im Rahmen der inflammatorischen Antwort kommt es bei den neutrophilen Granulozyten zu Exozytose intrazellulärer Vesikel. Die Vesikel der PMN lassen sich in drei Gruppen unterteilen. Zum einen die Gruppe der sekretorischen Vesikel. Diese enthalten Membranproteine und Moleküle, die in die Membran eingebaut werden, wie z. B. das Cytochrom b_{558} . Die zweite Gruppe beinhaltet die peroxidase-negativen Granula, deren Bestandteile Lysozyme, Lactoferrin,

Gelatinase u. a. sind. Die dritte Gruppe sind die peroxidase-positiven oder azurophilen Granula. Deren Hauptbestandteil ist die Myeloperoxidase, die einen Anteil von 5% am gesamten Trockengewicht eines PMN ausmacht [8,20,60]. Die MPO spielt eine entscheidende Rolle in der Abwehr von Erregern, es wird nach Aktivierung der Zellen zusammen mit anderen Lysosomen freigesetzt. In dem chemischen Vorgang der MPO katalisiert das Enzym die Reaktion von H_2O_2 , das ein Produkt der NADPH-Oxidase ist, und einem Halogen, zumeist Chlor, zu hypochloriger Säure [60].

In unserer Studie haben wir in einem Assay die MPO-Aktivität bestimmt, indem wir den zu untersuchenden Versuchsansätze TMB und H_2O_2 als Substrat zugegeben haben. Die MPO in den Ansätzen hat die Oxidationsreaktion katalisiert, wodurch das TMB die Farbe änderte. Diese Änderung wurde photometrisch gemessen und als Maß der Sekretion und der Aktivität der MPO benutzt.

Die Versuchsgruppen waren wie bisher eine NaCl-, eine HES 130-, eine HES 200- und eine Gelatine-Gruppe. Die isolierten PMN wurden mittels PMA in Anwesenheit der entsprechenden Infusionslösungen stimuliert. Unser Ergebnis ist, dass neutrophile Granulozyten, die in Anwesenheit von HES 130 und HES 200 stimuliert wurden, nicht signifikant mehr MPO sezernierten als die unstimulierten Zellen in der Negativkontrolle. Dagegen wurde in den Versuchsansätzen mit NaCl und Gelatine ein signifikant höherer Spiegel der MPO gemessen im Vergleich zur Negativkontrolle. Analog zu den bisher erhobenen Ergebnissen zeigt sich auch in diesem Versuchsaufbau, dass die inflammatorische Reaktion der neutrophilen Granulozyten, hier in Form der Sekretion der Myeloperoxidase, bei den in Anwesenheit von HES stimulierten Zellen abgeschwächt ist und somit ein Effekt auf die Zellen in einem inflammatorischen Geschehen beeinflussen kann.

Diese Ergebnisse aus unserer Studie passen zu tierexperimentellen Daten anderer Arbeitsgruppen. Wang et al. haben in einer Studie zum hämorrhagischen Schock und einer Infusionstherapie eine Versuchsreihe an Ratten durchgeführt [109]. Es wurde über einen Zeitraum von einer Stunde eine Hypovolämie durch Blutung bis zu einem systolischen Blutdruck von 40 mmHg an den Tieren bewirkt. Im Anschluss wurden die Tiere in einer Gruppe getötet, in einer anderen mit NaCl, in einer mit HES 130, in einer mit dem entwendeten Blut therapiert. Es wurden die

Entwicklung eines *capillary leak* und die Freisetzung verschiedener Aktivitätsmoleküle gemessen, darunter die MPO. Dieses Enzym wurde in dieser Studie als Marker für den Grad der Leukozytenakkumulation im Lungengewebe genutzt.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass nach Ersatz des entwendeten Blutes der Ratten durch HES 130 es zu einer signifikant höheren MPO-Konzentration im Lungengewebe kam als in der Negativkontrolle. In der Gruppe, in der Ringerlaktat als Infusionsmedium gegeben wurde, kam es sogar zu einer Verdreifachung der MPO-Konzentration gegenüber der Negativkontrolle. Außerdem war die MPO-Konzentration in der Ringerlaktat-Gruppe signifikant höher als in der HES 130 – Gruppe. Die Gruppe, in der das Blut retransfundiert wurde, zeigte keinen Vorteil gegenüber der HES-Gruppe im Bezug auf die MPO-Sekretion.

In weiteren tierexperimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass bei Ratten, die in Folge von eine Cöcalligation und –punktion eine Sepsis hatten, durch Infusion von Hydroxyethylstärke die MPO-Aktivität unterdrücken konnte [39,40,41].

Somit passen unsere Daten zu denen aus tierexperimentellen Studien, dass von Leukozyten in Anwesenheit von HES 130 die Myeloperoxidase signifikant vermindert sezerniert wird als in Anwesenheit von NaCl, bzw. Ringerlösung. Der Mechanismus hinter dieser Beobachtung muss Gegenstand weiterer Untersuchungen werden.

7 Zusammenfassung

Die Bedeutung der systemischen inflammatorischen Erkrankungen ist in der Intensivmedizin nach wie vor von großer Bedeutung. Die Inzidenz und die Letalität steigen trotz intensiver Forschung. Das Multiorganversagen als Folge der komplexen Abläufe einer fehlgesteuerten Erregerabwehr steht dabei im Vordergrund.

In der SIRS, bzw. der Sepsis kommt es durch einen pathologischen Reiz wie z. B. einer Operation, einem Trauma oder einer Bakteriämie zu einer Aktivierung des Immunsystems. Die Primärantwort führt zur generalisierten Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, die ungerichtet Zytokine und Chemokine freisetzen. Diese Mechanismen führen zu Vasodilatation und Gefäßschädigung mit Folge von intravasalem Volumenverlust. Hieraus resultiert ein relativer und absoluter Volumenmangel, dessen Therapie ein vorrangiges Ziel in der Intensivmedizin ist. Die zielgerichtete Volumentherapie ist notwendig, um ein ausreichend hohes Herzzeitvolumen zu generieren und damit eine suffiziente Organperfusion gewährleisten zu können. Kolloidale Infusionslösungen scheinen aufgrund von experimentellen und tierexperimentellen Studien zum Volumenausgleich aufgrund des höheren onkotischen Druckes ideal zur Initialtherapie geeignet. Durch ein bisher unklares Nebenwirkungsspektrum sind diese aber in der Langzeitanwendung sehr umstritten und aktuell zur Sepsis-Therapie nicht empfohlen.

Außerdem kommt es im inflammatorischen Geschehen durch Leukozytenadhäsion zu Mikrozirkulationsstörung in den Endstromgebieten und durch Diapedese zur Leukozytentransposition ins Gewebe, wo diese durch Freisetzung ihrer zytotoxischen Substanzen und Radikale weitere Gewebeschädigungen verursachen. Diese Mechanismen können zu schweren Organschädigungen führen, die als schwerste Ausprägung im Multiorganversagen münden können.

Für diese Studie wurde folgende Hypothese zugrunde gelegt: Durch die Applikation von HES kommt es zu einer reduzierten inflammatorischen Reaktion

der Granulozyten hinsichtlich (1) der Expression von Oberflächenmolekülen, (2) der Degranulation von Enzymen und (3) der Produktion von zytotoxischen Radikalen. Das Ziel der Studie war, den antiinflammatorischen Effekt unterschiedlicher Infusionslösungen, kristalloide und kolloidale, auf neutrophile Granulozyten zu untersuchen.

Für diese Studie wurden humane Leukozyten aus menschlichem Vollblut isoliert und *in vitro* stimuliert in Anwesenheit der zu untersuchenden Infusionslösungen. Das Ausmaß der Aktivierung der Zellen wurde auf Proteinebene anhand der Expression von Adhäsionsmolekülen CD 11b und CD 66b und dem membranständigen Flavocytochrom b_{558} detektiert, sowie anhand der Sekretion der Myeloperoxidase und der Produktion von Sauerstoffradikalen. Die Expression der Adhäsionsmoleküle und des Cytochrom b_{558} auf der Zelloberfläche wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Menge der freigesetzten Myeloperoxidase wurde per MPO-Assay und die Sauerstoffradikalproduktion mit dem SOD-Assay bestimmt. Auf molekularer Ebene wurde die mRNA-Menge mittels rt-PCR für die Adhäsionsmoleküle CD 11b, CD 18 und für die Untereinheiten der NADPH-Oxidase, p22PHOX, p40PHOX, p47PHOX, p67PHOX und gp91PHOX gemessen.

Es wurden fünf Gruppen gebildet, (1) die Kontrollgruppe ohne Stimulation, (2) die NaCl Gruppe, (3) die HES 130 Gruppe (6% HES 130/0,4) (4) die HES 200-Gruppe (10% HES 200/0,5) und (5) die Gelatine-Gruppe (4% Gelatine). In diesen Gruppen wurden die Leukozyten über einen Zeitraum von zwei Stunden in Anwesenheit der entsprechenden Infusionslösungen stimuliert. Die Stimulation erfolgte mittels LPS (Lipopolysaccharid von *E. coli* 0111:B4) und mittels PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate).

In unserer *in vitro* Studie konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

1. Unter Stimulation durch LPS zeigten die PMN in Anwesenheit von NaCl (4), HES 200 (4) und Gelatine (5) eine signifikant erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls CD 11b an der Zelloberfläche im Vergleich zur Negativkontrolle (1). In der HES 130 Gruppe (3) war die Expression nicht erhöht.

2. Unter Stimulation durch LPS zeigten die PMN in Anwesenheit von NaCl (2) und Gelatine (5) eine signifikant erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls CD 66 an der Zelloberfläche im Vergleich zur Negativkontrolle (1). In der HES 130 (3) und der HES 200 Gruppe (4) war die Expression nicht signifikant erhöht.
3. Unter Stimulation durch LPS zeigten die PMN in Anwesenheit von NaCl (2), HES 200 (4) und Gelatine (5) eine signifikant erhöhte Expression des Cytochrom b_{558} im Vergleich zur Negativkontrolle (1). In der HES 130 Gruppe (3) war die Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (1) nicht erhöht und war signifikant niedriger als in der HES 200 (4) und Gelatine Gruppe (5).
4. Unter Stimulation durch PMA zeigte sich in NaCl (2) und Gelatine Gruppe (5) eine signifikant erhöhte MPO-Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle (1), in der Gelatine Gruppe (5) auch signifikant höher als in der HES 130 Gruppe (3). In der HES 130 (3) und der HES 200 (4) Gruppe war die Expression nicht höher als in der Negativkontrolle (1).
5. Unter Stimulation mit PMA zeigte sich im SOD-Assay eine in allen Gruppen signifikant erhöhte Superoxidanionenproduktion im Vergleich zur Negativkontrolle.
6. Unter Stimulation durch LPS wiesen wir auf molekularer Ebene in der NaCl Gruppe (2) für die Moleküle CD 11b, CD 18, gp91*PHOX*, p47*PHOX* und p67*PHOX* eine signifikant erhöhte mRNA Expression nach. In der HES 200 Gruppe (4) wiesen wir für drei Moleküle CD 11b, CD 18 und das p47*PHOX* eine signifikant erhöhte mRNA Expression nach. In der HES 130 Gruppe (3) wiesen wir für zwei Moleküle CD 18 gp91*PHOX* eine signifikant erhöhte mRNA Expression nach, im Vergleich zur Negativkontrolle (1).

Die Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass in Anwesenheit von HES 130 die *in vitro* stimulierten Leukozyten signifikant weniger aktiviert werden im Gegensatz zu den Zellen, die in Anwesenheit von NaCl, HES 200 oder Gelatine stimuliert werden.

Schlussfolgernd scheint HES 130/0.4 auf die in vitro stimulierten Leukozyten einen antiinflammatorischen Effekt zu haben, in dem die Expression von Adhäsionsmolekülen, der membranständigen NADPH-Oxidase und der Sekretion von zytotoxischen Substanzen signifikant reduziert wird. Folglich könnte der Einsatz von HES 130/0.4 in der Initialtherapie der generalisierten inflammatorischen Reaktion zu einer Reduktion der überschießenden Leukozytenreaktion und somit zu einer Reduktion der Komplikationen führen.

8 Literaturverzeichnis

1. Abraham E (2003) Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med* 31: S195 – 199.
2. Adams HA (2007) Volumen- und Flüssigkeitsersatz – Physiologie, Pathophysiologie, Pharmakologie und klinischer Einsatz (Teil 1). *Anästh Intensivmed* 48: 448 – 460.
3. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulmé R, Lepage E, Le Gall JR (2002) Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 28: 108 – 121.
4. Andrews PC, Parnes C, Krinsky NI (1984) Comparison of myeloperoxidase and hemi-myeloperoxidase with respect to catalysis, regulation, and bactericidal activity. *Arch Biochem Biophys* 228: 439 – 442.
5. Angus DC, Wax RS (2001) Epidemiology of sepsis: An update. *Crit Care Med* 29: 109 – 116.
6. Annane D, Siami S, Jaber S, Martin C, Elatrous S, Declère AD, Preiser JC, Outin H, Troché G, Charpentier C, Trouillet JL, Kimmoun A, Forceville X, Darmon M, Lesur O, Reignier J, Abroug F, Berger P, Clec'h C, Cousson J, Thibault L, Chevret S; CRISTAL Investigators (2013) Effects of fluid resuscitation with colloids vs crystalloids on mortality in critically ill patients presenting with hypovolemic shock: the CRISTAL randomized trial. *JAMA* 310: 1809 – 1817.
7. Arnaout MA (1990) Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 75: 1037 – 1050.
8. Arnhold J (2004) Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Mosc)* 69: 4 – 9.
9. Awad S, Allison SP, Lobo DN (2008) The history of 0.9% saline. *Clin Nutr* 27: 179 – 188.
10. AWMF, S3-Leitlinie Intravasale Volumentherapie beim Erwachsenen 2014 (2013) Herausgeber: Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (federführend), *AWMF-Register-Nr.:* 001/020.
11. Babior BM (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* 93: 1464 – 1476.

12. Barnes TC, Anderson ME, Edwards SW, Moots RJ (2012) Neutrophil-derived reactive oxygen species in SSc. *Rheumatology (Oxford)* 51: 1166 – 1169.
13. Bauer M, Brunkhorst F, Welte T, Gerlach H, Reinhart K (2006) Sepsis. Aktuelle Aspekte zu Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. *Anaesthesist* 55: 835 – 845.
14. Bayer O, Reinhart K, Sakr Y, Kabisch B, Kohl M, Riedemann NC, Bauer M, Settmacher U, Hekmat K, Hartog CS (2011) Renal effects of synthetic colloids and crystalloids in patients with severe sepsis: a prospective sequential comparison. *Crit Care Med* 39: 1335 – 1342.
15. Bayer O, Kohl M, Kabisch B, Sakr Y, Schelenz C, Bauer M, Riedemann N, Badreldin A, Doenst T, Hartog C, Reinhart K (2011) Effects of synthetic colloids on renal function in cardiac surgical patients. *Intensive Care Med* 37: S202.
16. Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G, Cecconi O (1994) Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med* 45: 361 – 78.
17. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101: 1644 – 1655.
18. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA (1997) Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process. *Chest* 112: 235 – 243.
19. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (2009) ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest* 136: e28.
20. Borregaard N, Cowland JB (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89: 3503 – 3521.
21. Bøyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 97: 77 – 89.

22. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF (2006) Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 368: 157 – 69.
23. Brun-Buisson C (2000) The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med* 26: 64 – 74.
24. Brunkhorst, FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, Moerer O, Gruendling M, Oppert M, Grond S, Olthoff D, Jaschinski U, John S, Rossaint R, Welte T, Schaefer M, Kern P, Kuhnt E, Kiehntopf M, Hartog C, Natanson C, Loeffler M, Reinhart K, for the German Competence Network Sepsis (SepNet) (2008) Intensive Insulin Therapy and Pentastarch Resuscitation in Severe Sepsis. *N Engl J Med* 358: 125 – 139.
25. Burns AR, Walker DC, Brown ES, Thurmon LT, Bowden RA, Keese CR, Simon SI, Entman ML, Smith CW (1997) Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *J Immunol* 159: 2893 – 2903.
26. Buttenschoen K, Schneider ME, Utz K, Kornmann M, Beger HG, Buttenschoen DC (2009) Effect of major abdominal surgery on endotoxin release and expression of Toll-like receptors 2/4. *Langenbecks Arch Surg* 394: 293 – 302.
27. Chua HR, Venkatesh B, Stachowski E, Schneider AG, Perkins K, Ladanyi S, Kruger P, Bellomo R (2012) Plasma-Lyte 148 vs 0.9% saline for fluid resuscitation in diabetic ketoacidosis. *J Crit Care* 27: 138 – 145.
28. Cohen J (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885 – 91.
29. Coimbra R, Loomis W, Melbostad H, Tobar M, Porcides RD, Hoyt DB (2004) LPS-stimulated PMN activation and proinflammatory mediator synthesis is downregulated by phosphodiesterase inhibition: role of pentoxifylline. *J Trauma* 57: 1157 – 1163.
30. Conklyn MJ, Neote K, Showell HJ (1996) Chemokine-dependent upregulation of CD11b on specific leukocyte subpopulations in human whole blood: effect of anticoagulant on rantes and MIP-1 beta stimulation. *Cytokine* 8: 762 – 766.
31. Davies MG, Hagen P-O (1997) Systemic inflammatory response syndrome. *British Journal of Surgery* 84: 920 – 935.
32. Davis HM, Carpenter DC, Stahl JM, Zhang W, Hynicka WP, Griswold DE (2000) Human granulocyte CD11b expression as a pharmacodynamic biomarker of inflammation. *J Immunol Methods* 240: 125 – 32.

33. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb SA, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R; **Surviving Sepsis Campaign Guidelines** Committee including the Pediatric Subgroup (2013) Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 41: 580 – 637.
34. Dieterich HJ, Weissmuller T, Rosenberger P, Eltzschig HK (2006) Effect of hydroxyethyl starch on vascular leak syndrome and neutrophil accumulation during hypoxia. *Crit Care Med* 34: 1775– 1782.
35. Dörger M, Allmeling AM, Neuber A, Behr J, Rambeck W, Krombach F (1997) Interspecies comparison of rat and hamster alveolar macrophage antioxidative and oxidative capacity. *Environ Health Perspect* 105: 1309 – 1312.
36. Engel C, Brunkhorst FM, Bone H-G, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K (2007) Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 33: 606 – 618.
37. Engel C, Brunkhorst FM, Löffler M, Reinhart K (2007) Kompetenznetz Sepsis – Diagnose und Epidemiologie der Sepsis. *Med Welt* 58: 307 – 310.
38. Epling CL, Stites DP, McHugh TM, Chong HO, Blackwood LL, Wara DW (1992) Neutrophil function screening in patients with chronic granulomatous disease by a flow cytometric method. *Cytometry* 13: 615.
39. Feng X, Ren B, Xie W, Huang Z, Liu J, Guan R, Duan M, Xu J (2006) Influence of hydroxyethyl starch 130/0.4 in pulmonary neutrophil recruitment and acute lung injury during polymicrobial sepsis in rats. *Acta Anaesthesiol Scand* 50: 1081 – 1088.
40. Feng X, Yan W, Liu X, Duan M, Zhang X, Xu J (2006) Effects of hydroxyethyl starch 130/0.4 on pulmonary capillary leakage and cytokines production and NF-κB activation in CLP-induced sepsis in rats. *J Surg Res* 135: 129 – 136.
41. Feng X, Yan W, Wang Z, Liu J, Yu M, Zhu S, Xu J (2007) Hydroxyethyl Starch, but Not Modified Fluid Gelatin, Affects Inflammatory Response in a Rat Model of Polymicrobial Sepsis with Capillary Leakage. *Anesth Analg* 104: 624 – 630.

42. Finfer S, Bellomo R, Boyce N, French J, Myburgh J, Norton R; SAFE Study Investigators (2004) A comparison of albumin and saline for fluid resuscitation in the intensive care unit. *N Engl J Med* 350: 2247 – 2256.
43. Fridovich, I (1985) Cytochrome c. In: Greenwald RA (ed.). *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 213 – 215.
44. Furebring M, Håkansson L, Venge P, Sjölin J (2004) Differential expression of the C5a receptor and complement receptors 1 and 3 after LPS stimulation of neutrophils and monocytes. *Scand J Immunol* 60: 494 – 499.
45. Gheorghe C, Dadu R, Blot C, Barrantes F, Vazquez R, Berianu F, Feng Y, Feintzig I, Amoaeng-Adjepong Y, Manthous CA (2010) Hyperchloremic metabolic acidosis following resuscitation of shock. *Chest* 138: 1521 – 1522.
46. Glasser L1, Fiederlein RL (1990) The effect of various cell separation procedures on assays of neutrophil function. A critical appraisal. *Am J Clin Pathol* 93: 662 – 669.
47. Guidet B, Martinet O, Boulain T, Philippart F, Poussel JF, Maizel J, Forceville X, Feissel M, Hasselmann M, Heininger A, Van Aken H (2012) Assessment of hemodynamic efficacy and safety of 6% hydroxyethylstarch 130/0.4 vs. 0.9% NaCl fluid replacement in patients with severe sepsis: The CRYSTMAS study. *Crit Care* 16: R94.
48. Gustot T (2011) Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory response. *Curr Opin Crit Care* 17: 153 – 159.
49. Haase N, Perner A, Hennings LI, Siegemund M, Lauridsen B, Wetterslev M, Wetterslev J (2013) Hydroxyethyl starch 130/0.38-0.45 versus crystalloid or albumin in patients with sepsis: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *BMJ* 346: f839.
50. Haase N, Perner A (2013) Hydroxyethyl starch for resuscitation. *Curr Opin Crit Care* 19: 321 – 325.
51. Hammond ME, Lapointe GR, Feucht PH, Hilt S, Gallegos CA, Gordon CA, Giedlin MA, Mullenbach G, Tekamp-Olson P (1995) IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J Immunol* 155: 1428 – 1433.
52. Handrigan MT, Burns AR, Donnachie EM, Bowden RA (2005) Hydroxyethyl starch inhibits neutrophil adhesion and transendothelial migration. *Shock* 24: 434 – 9.

53. Hardy MM, Flickinger AG, Riley DP, Weiss RH, Ryan US (1994) Superoxide dismutase mimetics inhibit neutrophil-mediated human aortic endothelial cell injury in vitro. *J Biol Chem* 269: 18535 – 18540.
54. Heckel K, Winkelmann B, Strunden MS, Basedow A, Schuster A, Schumacher U, Kiefmann R, Reuter DA, Goetz AE (2012) Tetrastarch sustains pulmonary microvascular perfusion and gas exchange during systemic inflammation. *Crit Care Med* 40: 518 – 531.
55. Hogan JJ (1915) The intravenous use of colloidal (gelatin) solutions in shock. *JAMA* 64: 721 – 726.
56. Hogg N, Berlin C (1995) Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking. *Immunol.Today* 16: 327 – 330.
57. Kalmar JR, Arnold RR, Warbington ML, Gardner MK (1988) Superior leukocyte separation with a discontinuous one-step Ficoll-Hypaque gradient for the isolation of human neutrophils. *J Immunol Methods* 110: 275 – 281.
58. Khan R, Kirschenbaum LA, Larow C, Astiz ME (2011) The effect of resuscitation fluids on neutrophil-endothelial cell interactions in septic shock. *Shock* 36: 440 – 444.
59. Kern JW, Shoemaker WC (2002) Meta-analysis of hemodynamic optimization in high-risk patients. *Crit Care Med* 30: 1686 – 1692.
60. Klebanoff SJ (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 77: 598 – 625.
61. Larson RS, Springer TA (1990) Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* 114: 181 – 217.
62. Lee WL, Downey GP (2001) Neutrophil activation and acute lung injury. *Curr Opin Crit Care* 7: 1 – 7.
63. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G (2003) SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31: 1250 – 1256.
64. Ley K, Bullard DC, Arbones ML, Bosse R, Vestweber D, Tedder TF, Beaudet AL (1995) Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med* 181: 669 – 675.
65. Lockyer JM, Colladay JS, Alperin-Lea WL, Hammond T, Buda AJ (1998) Inhibition of nuclear factor-kappaB-mediated adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Circ Res* 82: 314 – 320.

66. Lv R, Zhou W, Chu C, Xu J (2005) Mechanism of the effect of hydroxyethyl starch on reducing pulmonary capillary permeability in a rat model of sepsis. *Ann Clin Lab Sci* 35: 174 – 183.
67. Lynn WA, Raetz CR, Qureshi N, Golenbock DT (1991) Lipopolysaccharide-induced stimulation of CD11b/CD18 expression on neutrophils. Evidence of specific receptor-based response and inhibition by lipid A-based antagonists. *J Immunol* 147: 3072 – 3079.
68. Malech HL, Deleo FR, Quinn MT (2014) The role of neutrophils in the immune system: an overview. *Methods Mol Biol* 1124: 3 – 10.
69. Mayr FB, Yende S, Angus DC (2014) Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 5: 4 – 11.
70. McPhail LC, Harvath L. 3 (1994) Signal transduction in neutrophil oxidative metabolism and chemotaxis *The Neutrophil* edited by Abramson J.S., Wheeler J.G., IRL Press at Oxford University Press 63 – 91.
71. Miller CH, Levy NB (1989) Effects of storage conditions on lymphocyte phenotypes from healthy and diseased persons. *J Clin Lab Anal* 3: 296 – 300.
72. Moerer O, Quintel M (2009) Definition, Epidemiologie und ökonomische Aspekte der Sepsis bei Erwachsenen. *Internist* 50: 788 – 798.
73. Myburgh J, Bellomo R, Cass A, Finfer S, French J, Gattas D, Glass P, Lee J, Lipman J, Liu B, McArthur C, McGuinness S, Rajbhandari D, Taylor C, Webb S (2011) Crystalloid versus Hydroxyethyl Starch Trial (CHEST) Management Committee. The Crystalloid versus Hydroxyethyl Starch Trial: protocol for a multi-centre randomised controlled trial of fluid resuscitation with 6% hydroxyethyl starch (130/0.4) compared to 0.9% sodium chloride (saline) in intensive care patients on mortality. *Intensive Care Med* 37: 816 – 823.
74. Nair KS, Zingde SM (2001) Adhesion of neutrophils to fibronectin: role of the cd66 antigens. *Cell Immunol* 208: 96 – 106.
75. Nash GB, Jones JG, Mikita J, Christopher B, Dormandy JA (1988) Effects of preparative procedures and of cell activation on flow of white cells through micropore filters. *Br J Haematol* 70: 171 – 176.
76. Nauseef WM (2014) Isolation of human neutrophils from venous blood. *Methods Mol Biol* 1124: 13 – 18.
77. Nohé B, Johannes T, Reutershan J, Rothmund A, Haeberle HA, Ploppa A, Schroeder TH, Dieterich HJ (2005) Synthetic colloids attenuate leukocyte-

- endothelial interactions by inhibition of integrin function. *Anesthesiology* 103: 759 – 767.
78. Nolan J (2001) Fluid resuscitation for the trauma patient. *Resuscitation* 48: 57 – 69.
79. O'Malley CM, Frumento RJ, Hardy MA, Benvenisty AI, Brentjens TE, Mercer JS, Bennett-Guerrero E (2005) A randomized, double-blind comparison of lactated Ringer's solution and 0.9% NaCl during renal transplantation. *Anesth Analg* 100: 1518 – 1524.
80. Peng ZY, Kellum JA (2013) Perioperative fluids: a clear road ahead? *Curr Opin Crit Care* 19: 353 – 358.
81. Perel P, Roberts I, Ker K (2013) Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev* ;2: CD000567.
82. Perner A, Haase N, Guttormsen AB, Tenhunen J, Klemenzson G, Åneman A, Madsen KR, Møller MH, Elkjær JM, Poulsen LM, Bendtsen A, Winding R, Steensen M, Berezowicz P, Søre-Jensen P, Bestle M, Strand K, Wiis J, White JO, Thornberg KJ, Quist L, Nielsen J, Andersen LH, Holst LB, Thormar K, Kjældgaard AL, Fabritius ML, Mondrup F, Pott FC, Møller TP, Winkel P, Wetterslev J; 6S Trial Group; Scandinavian Critical Care Trials Group (2012) Hydroxyethyl Starch 130/0.4 versus Ringer's Acetate in Severe Sepsis. *N Engl J Med* 367: 124 – 134.
83. Perner A, Haase N, Wetterslev J, Aneman A, Tenhunen J, Guttormsen AB, Klemenzson G, Pott F, Bødker KD, Bådstøløkken PM, Bendtsen A, Søre-Jensen P, Tousi H, Bestle M, Pawlowicz M, Winding R, Bülow HH, Kancir C, Steensen M, Nielsen J, Fogh B, Madsen KR, Larsen NH, Carlsson M, Wiis J, Petersen JA, Iversen S, Schøidt O, Leivdal S, Berezowicz P, Pettilä V, Ruokonen E, Klepstad P, Karlsson S, Kaukonen M, Rutanen J, Karason S, Kjældgaard AL, Holst LB, Wernerman J; Scandinavian Critical Care Trials Group (2011) Comparing the effect of hydroxyethyl starch 130/0.4 with balanced crystalloid solution on mortality and kidney failure in patients with severe sepsis (6S--Scandinavian Starch for Severe Sepsis/Septic Shock trial): study protocol, design and rationale for a double-blinded, randomised clinical trial. *Trials* 12: 24. doi: 10.1186/1745-6215-12-24.
84. Perner A, Haase N, Winkel P, Guttormsen AB, Tenhunen J, Klemenzson G, Müller RG, Aneman A, Wetterslev J (2014) Long-term outcomes in patients with severe sepsis randomised to resuscitation with hydroxyethyl starch 130/0.42 or Ringer's acetate. *Intensive Care Med* 40: 927 – 934.

85. Pick E, Mizel D (1981) Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods* 46: 211 – 226.
86. Prowle JR, Bellomo R (2013) Fluid administration and the kidney. *Curr Opin Crit Care* 19: 308 – 314.
87. Raffael A., Nebe C.Th., Valet G (Stuttgart 1994) Grundlagen der Durchflußzytometrie in Schmitz-Rothe (Hrsg) Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Schattauer, S. 3-48.
88. Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone H-G, Bardutzky J, Dempfle C-E, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Gründling M, John S, Kern W, Kreymann G, Krüger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stüber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T (2010) Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. 1. Revision der S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI). *AWMF-Register-Nr.:079/001*.
89. Repo H, Jansson SE, Leirisalo-Repo M (1995) Anticoagulant selection influences flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo and ex vivo. *J Immunol Methods* 185: 65 – 79.
90. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M (2001) Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 345: 1368-1377.
91. Rossaint J , Berger , Kraft F, Van Aken H, Giesbrecht N, Zarbock A (2015) Hydroxyethyl starch 130/0.4 decreases inflammation, neutrophil recruitment, and neutrophil extracellular trap formation. *Br J Anaesth* 114: 509 – 519.
92. Ruoslahti E (1991) Integrins. *J Clin Invest* 87: 1 – 5.
93. Saddler JM, Horsey PJ (1987) The new generation gelatins. A review of their history, manufacture and properties. *Anaesthesia* 42: 998 – 1004.
94. Schleimer RP, Rutledge BK (1986) Cultured human vascular endothelial cells acquire adhesiveness for neutrophils after stimulation with interleukin 1, endotoxin, and tumorpromoting phorbol diesters. *J Immunol* 136: 649-654.

95. Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC (2005) Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol* 78: 1025 – 1042.
96. Skhirtladze K, Base EM, Lassnigg A, Kaider A, Linke S, Dworschak M, Hiesmayr MJ (2014) Comparison of the effects of albumin 5%, hydroxyethyl starch 130/0.4 6%, and Ringer's lactate on blood loss and coagulation after cardiac surgery. *Br J Anaesth* 112: 255 – 264.
97. Smith JA (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 56: 672 – 686.
98. Springer TA (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425 – 433.
99. Springer TA (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation und leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301 – 314.
100. Strunden MS, Heckel K, Goetz AE, Reuter DA (2011) Perioperative fluid and volume management: physiological basis, tools and strategies. *Ann Intensive Care* 1: 2.
101. Tarpey MM, Fridovich I (2001) Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res* 89: 224 – 36.
102. Thomas-Rueddel DO, Vlasakov V, Reinhart K, Jaeschke R, Rueddel H, Hutagalung R, Stacke A, Hartog CS (2012) Safety of gelatin for volume resuscitation--a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* 38: 1134 – 1142.
103. Tian J, Lin X, Guan R, Xu JG (2004) The effects of hydroxyethyl starch on lung capillary permeability in endotoxic rats and possible mechanisms. *Anesth Analg* 98: 768 –74.
104. Tian J, Lin X, Li YH, Xu JG (2005) Influence of hydroxyethyl starch on lipopolysaccharide-induced tissue nuclear factor kappa B activation and systemic TNF-alpha expression. *Acta Anaesthesiol Scand* 49: 1311–1317.
105. van Eeden SF, Klut ME, Walker BA, Hogg JC (1999) The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J Immunol Methods* 232: 23 – 43.
106. Vincent JL (2007) The pros and cons of hydroxyethyl starch solutions. *Anesth Analg* 104: 484 – 486.

107. Vulcano M, Alves Rosa MF, Minnucci FS, Cherňavsky AC, Isturiz MA (1998) N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) inhibits tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human neutrophils. *Clin Exp Immunol* 113: 39 – 47.
108. Wafaisade A, Lefering R, Bouillon B, Sakka SG, Thamm OC, Paffrath T, Neugebauer E, Maegele M, Trauma Registry of the German Society for Trauma Surgery (2011) Epidemiology and risk factors of sepsis after multiple trauma: An analysis of 29,829 patients from the Trauma Registry of the German Trauma Society. *Crit Care Med* 39: 621 – 628.
109. Wang P, Li Y, Li J (2009) Hydroxyethyl starch 130/0.4 prevents the early pulmonary inflammatory response and oxidative stress after hemorrhagic shock and resuscitation in rats. *Int Immunopharmacol* 9: 347 – 353.
110. Welters ID, Spangenberg U, Menzebach A, Engel J, Menges T, Langefeld TW, Hempelmann G (2000) The effect of different volume expanders on neutrophil granulocyte function in vitro. *Anaesthesist* 49: 196 – 201.
111. Weiss SJ (1989) Tissue Destruction by Neutrophils. *N Engl J Med* 320: 365 – 376.
112. Whyte MK, Hardwick SJ, Meagher LC, Savill JS, Haslett C (1993) Transient elevations of cytosolic free calcium retard subsequent apoptosis in neutrophils in vitro. *J Clin Invest* 92: 446 – 455.
113. Xie J, Lv R, Yu L, Huang W (2010) Hydroxyethyl starch 130/0.4 exerts its anti-inflammatory effect in endotoxemic rats by inhibiting the TLR4/NF-kappaB signaling pathway. *Ann Clin Lab Sci* 40: 240 – 246.
114. Yunos NM, Bellomo R, Hegarty C, Story D, Ho L, Bailey M (2012) Association between a chloride-liberal vs chloride-restrictive intravenous fluid administration strategy and kidney injury in critically ill adults. *JAMA* 308: 1566 – 1572.
115. Zarychanski R, Abou-Setta AM, Turgeon AF, Houston BL, McIntyre L, Marshall JC, Fergusson DA (2013) Association of hydroxyethyl starch administration with mortality and acute kidney injury in critically ill patients requiring volume resuscitation: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 309: 678 – 688.
116. Zhu L, He P (2006) fMLP-stimulated release of reactive oxygen species from adherent leukocytes increases microvessel permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H365 – 372.
117. Zimmermann B, Dalhoff K, Braun J (1999) Impaired neutrophil exocytosis in patients with severe pneumonia. *Intensive Care Med* 25: 44 – 51..

9 Anhang

9.1 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. A. E. Goetz für die Aufnahme in seine wissenschaftliche Arbeitsgruppe und für das Thema der Doktorarbeit. Durch seine freundliche und kompetente Unterstützung und Förderung hat er mir diese Arbeit und damit den beruflichen Einstieg in den Bereich der Anästhesiologie und Intensivmedizin ermöglicht.

Mein Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. med. R. Kiefmann für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für seine konstruktiven Anmerkungen und Hilfestellungen.

Ein ganz besonders großer Dank geht an Dr. Kai Heckel für seine grandiose Betreuung. Er hat es durch seinen unermüdliche tatkräftigen Einsatz und seine Begeisterung für die wissenschaftlichen Fragestellungen verstanden, mich für die Arbeit zu begeistern und immer wieder zu motivieren.

Herzlichen Dank gilt Herrn Prof. J. Dahm-Daphi aus der Abteilung der Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf für die freundliche Einweisung in das FACS-Gerät und für die Ermöglichung, die FACS-Messung durchführen zu können.

Mein Dank geht auch besonders an die MTA's Frau Monika Weber, Claudia Lüchau, Kirsten Pfeiffer-Drenkhahn und Sonja Schuppart für die freundliche Aufnahme ins Labor und für die liebevolle Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Und zu guter Letzt möchte ich meiner Freundin, meinen Eltern und meinen Geschwistern danken, die mich unermüdlich ermuntert und unterstützt haben ohne Druck auszuüben. Ohne sie hätte ich dieses Projekt nicht beendet.

9.2 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Martin Rudolf Strutz
Geburtsdatum /-ort: 20. November 1982 in Bremen

Schulbildung:

1989-1995 Grundschule, Orientierungsstufe
1995-2002 Gymnasium und Gymnasiale Oberstufe Freie evangelische Bekenntnisschule Bremen
06/2002 Abitur

Studium:

2003 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
2005 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/2008-07/2009 Praktisches Jahr:
Innere Medizin, Asklepios Klinik Barmbek, Hamburg
Anästhesiologie, UKE, Hamburg
Chirurgie, Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg
11/2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

seit 12/2009 Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

9.3 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Martin Strutz